

Filière Technologies du vivant

Orientation Chimie analytique

Diplôme 2008

Samuel Pellaud

*Quantification et caractérisation
des proanthocyanidines dans
Onobrychis viciifolia Scop*

Professeur

Umberto Piantini

Experte

Catherine Ionescu

Confidentiel / Vertraulich

☐ oui / ja ☐ non / nein

<input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV	Année académique / Studienjahr 2007/2008	No PS / Nr. PS ca/2008/76
Mandant / Auftraggeber <input type="checkbox"/> HES—SO Valais <input checked="" type="checkbox"/> Industrie Pancosma <input type="checkbox"/> Ecole hôte	Etudiant / Student Samuel Pellaud	Lieu d'exécution / Ausführungsort <input checked="" type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Ecole hôte
Professeur / Dozent Umberto Piantini	Expert / Experte (données complètes) Catherine Ionescu	

Titre / Titel

**Quantification et caractérisation des proanthocyanidines
dans "Onobrychis viciifolia Scop"**

Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele

Les propriétés antioxydantes des polyphénols présents dans les plantes sont très recherchées et il est nécessaire de disposer de méthodes analytiques pouvant quantifier les tanins condensés. Actuellement, les teneurs en tanin déterminées peuvent varier selon la méthode analytique appliquée. Il est donc primordial de disposer d'une méthode analytique globale et fiable validée.

Le but de ce travail de diplôme est donc de mettre au point une procédure analytique globale permettant de déterminer qualitativement et quantitativement les différents tanins présents dans "Onobrychis viciifolia Scop".

Cahier des charges:

- Maîtrise de l'hydrolyse des tannins
- Identification des mono-, di- et tri-mères présents dans l'extrait
- Implémentation d'une méthode analytique basée sur l'HPLC-MS permettant la quantification des tanins
- Analyse des tanins
- Mini-validation de la méthode globale

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum Resp. de filière Studiengangsleiter:  Etudiant/Student: 	Délais / Termine Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags: 01.09.2008 Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts: 21.11.2008 — 12.00 Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten: 28.11.2008 Défense orale / Mündliche Verfechtung: semaine/Woche 49
---	--

Quantification et caractérisation des proanthocyanidines dans *Onobrychis viciifolia* Scop.

Objectifs : Le but de ce travail est de mettre au point à partir de méthodes issues de la littérature une méthode d'analyse des tanins dans un extrait végétal et de l'appliquer à des extraits d'*Onobrychis viciifolia* Scop.

Résultats : L'hydrolyse HCl-butanol de l'extrait a permis de déterminer par épuisement la quantité totale de tanins dans les extraits et la plante (3.5%). La méthode de la thiolyse a permis de déterminer le pourcentage de chaque monomère dans les tanins en tant qu'unité d'élongation et d'unité terminale ainsi que le degré de polymérisation moyen (5.8). La reproductibilité de la méthode a été testée. Des tests d'électrophorèse capillaire micro micellaire ont démontré que la méthode pourrait également être utilisée pour la caractérisation d'extraits de plante.

Mots-clés : Proanthocyanidines, tanins condensés, HPLC-UV-MS, électrophorèse capillaire, *Onobrychis viciifolia* Scop., thiolyse, hydrolyse acide, épuisement.

Ziel : Das Ziel dieser Arbeit ist, eine Methode aus der Literatur zu entwickeln, um die Proanthocyanidine aus einem Extrakt von *Onobrychis viciifolia* Scop. zu analysieren

Resultate : Die Hydrolyse mit HCl und Butanol gab den Tannin Inhalt den Extrakt und der trockenen Pflanze. Die Methode der Thiolyse gab der Anteil den einzelnen Monomeren in die Tannine als Verlängerung- oder End-Einheit. Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde getestet. Tests mit der Kapillar-Elektrophorese-Mikro Mizellkonzentration, war hilfreich, um die Tannine zu isolieren (auf dem Elektropherogram, wenn der Gehalt an Tannin der Probe ist gering).

Schlüsselwörter : Proanthocyanidine, Tannine, HPLC-UV-MS, Kapillar-Elektrophorese, C-RMN, *Onobrychis viciifolia* Scop., Thiolyse, HCl-butanol.

Table des matières

1.	Liste des abréviations	5
2.	Introduction	6
3.	Etat des connaissances	6
3.1.	Les composés phénoliques	6
3.1.1.	Les acides phénoliques	7
3.1.2.	Les flavonoïdes.....	8
3.2.	Les tanins condensés.....	9
3.3.	Méthodes d'extraction et de séparation	12
3.3.1.	Extraction.....	12
3.3.2.	Séparation	12
3.3.3.	Fractionnement de la fraction polymérique	12
3.4.	Méthodes de préparation d'échantillon	13
3.4.1.	Hydrolyse acide – HCl et butanol	13
3.4.2.	Test à la vanilline	13
3.4.3.	Thiolyse	14
3.4.4.	Hydrolyse enzymatique	15
3.4.5.	Méthodes de précipitation	15
3.5.	Méthodes d'analyse.....	16
3.5.1.	HPLC-UV/MS.....	16
3.5.2.	Spectrométrie de masse.....	16
3.5.3.	H-RMN/C-RMN.....	16
3.5.4.	Electrophorèse capillaire	17
3.5.5.	Tests biologiques.....	17
4.	Définition d'une matrice d'analyse	17
5.	<i>Onobrychis viciifolia</i> Scop.....	19
6.	Résultats et discussion	21
6.1.	Analyse HPLC-MS d'un extrait	21
6.2.	Quantification.....	22
6.3.	Hydrolyse acide butanol	23
6.4.	Thiolyse	25
6.5.	Précipitation à la gélatine	32
6.6.	Précipitation à l'ytterbium	32
6.7.	Electrophorèse capillaire	33
6.8.	Fractionnement sur gel.....	35
6.9.	Hydrolyse enzymatique	36
6.10.	Chromatographie phase normale	37
6.11.	RMN-C	37
7.	Conclusion et perspectives	38
8.	Bibliographie	39
9.	Remerciements.....	42
10.	Annexes.....	42

1. Liste des abréviations

C	Catéchine
EC	Epicatéchine
Cg	Catéchine gallate
ECg	Epicatéchine gallate
GC	Gallocatechine
EGC	Epigallocatechine
GCg	Gallocatechine gallate
EGCg	Epigallocatechine gallate
HPLC	High pressure liquid chromatography/ chromatographie liquide haute pression
MS	Spectrométrie de masse
UV	Ultra-violet
m/z	Masse/charge
dPm	Degré de polymérisation moyen

2. Introduction

De nombreuses espèces végétales contiennent des composés comportant des noyaux phénoliques, appelés polyphénols. Parmi ces composés se trouvent les tanins hydrolysables et condensés. Les tanins condensés, aussi appelés proanthocyanidines, sont importants pour plusieurs raisons : ils donnent le goût au vin, l'amertume à de nombreux végétaux et possèdent des propriétés curatives d'intérêt vis-à-vis de certains cancers ainsi que des propriétés anti-radicalaires intéressantes. Le problème réside dans le fait que ces substances sont peu connues, bien que de nombreux travaux s'y soient intéressés. Pour pouvoir profiter au maximum de leurs propriétés intéressantes un rapport entre leur structure, leur composition, et leurs effets devrait être étudié, pour ce faire, une méthode d'analyse de ces composés doit être mise sur pied.

Les buts de ce travail sont, dans un premier temps, de mettre en place une méthode d'analyse des tanins en testant différentes préparations d'échantillon présentées par la littérature ainsi que diverses techniques analytiques ; puis, dans un deuxième temps, d'appliquer cette méthode à l'analyse de l'esparcette, aussi appelée sainfoin ou *Onobrychis viciifolia* Scop.

3. Etat des connaissances

Cette partie a pour but d'exposer des connaissances déjà existantes sur les tanins et les autres composés phénoliques présents dans les plantes, ainsi que les diverses méthodes d'analyse existantes. Dans une deuxième phase, le sainfoin [1,2] interviendra comme plante d'essai de la méthode.

Les tanins étant composés de noyaux aromatiques, les composés phénoliques sont présentés ci-après.

3.1. Les composés phénoliques

Parmi les principaux composés phénoliques synthétisés par les plantes se trouvent les flavonoïdes et les acides phénoliques.

3.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont principalement des dérivés de l'acide benzoïque (C_6H_5COOH) ou de l'acide gallique [3,4]. Ces composés peuvent former des liaisons ester avec de nombreux groupements alcools présents dans la plante, comme par exemple ceux présents sur la catéchine ou l'épicatéchine (cf. figure 8).

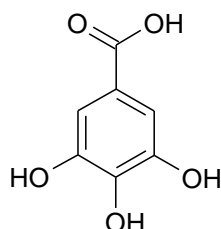


Figure 1 : acide gallique

Ces acides peuvent aussi former des liaisons ester avec des sucres et aussi entre eux. Il peut résulter de ces liaisons des polymères avec un sucre central. Ces polymères sont appelés tanins hydrolysables [4], un exemple est présentés dans la figure suivante :

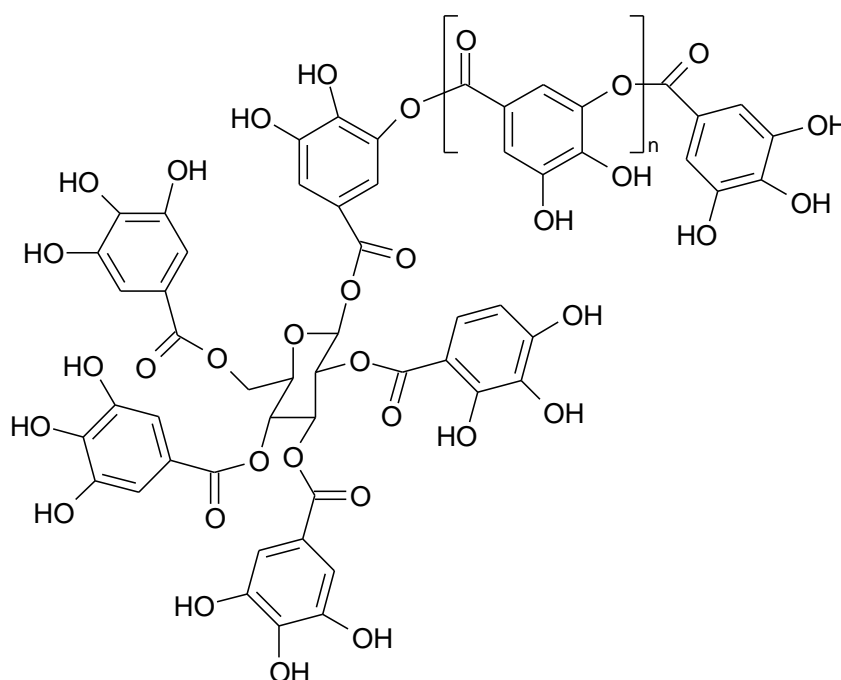


Figure 2 : exemple d'un tanin hydrolysable

Ces tanins n'ont pas de point commun avec les tanins condensés qui font l'intérêt de ce travail.

3.1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques qui comportent un squelette comprenant 15 atomes de carbone, dont 12 inclus dans deux cycles aromatiques reliés par une chaîne de trois carbones, comme présenté dans la figure suivante :

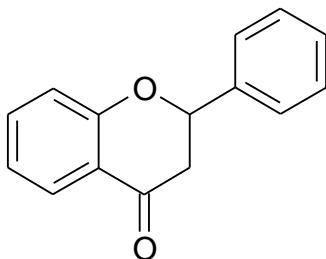


Figure 4 : structure de base des flavonoïdes

De nombreuses familles de flavonoïdes sont différenciées [6,7,3] en fonction du degré d'oxydation du noyau central et des substituants présents sur la molécule. On distingue ainsi les flavonols, les flavanols, les flavanones, les flavones, les isoflavones ainsi que de nombreuses autres classes.

Les flavonoïdes qui possèdent des groupements alcool peuvent former des liaisons ester avec des molécules comme l'acide gallique comme dans la figure suivante :

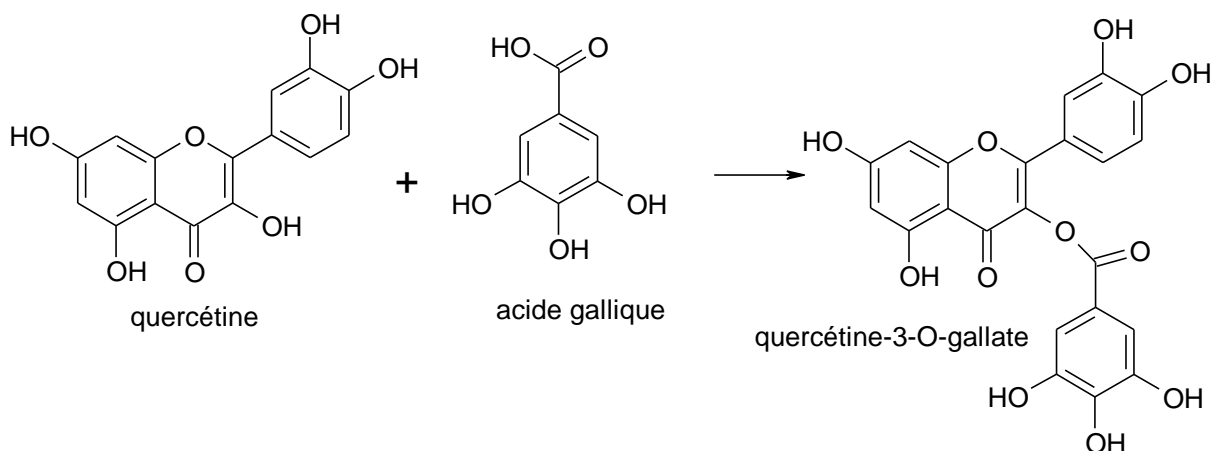


Figure 5 : réaction d'estérification entre un flavonol (quercétine) et l'acide gallique

Une catégorie de flavonoïdes joue un rôle plus important dans de nombreuses plantes. Il s'agit des flavan-3-ols qui peuvent polymériser et former des molécules complexes appelées tanins condensés.

3.2. Les tanins condensés

Les tanins condensés, appelés aussi proanthocyanidines, sont des composés formés à partir d'unités monomériques ou polymériques de flavan-3-ols, ce qui les différencie des tanins hydrolysables [3]. Pour illustrer l'appellation de flavan-3-ol, la figure suivante présente la numérotation de la molécule :

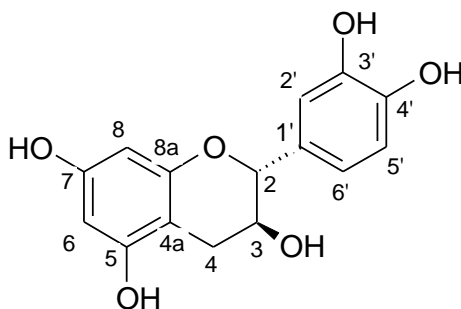


Figure 6 : numérotation d'une molécule de catéchine

Sur cette molécule de catéchine se trouve un groupement alcool en position 3, c'est la raison de l'appellation flavan-3-ol.

Une particularité des tanins condensés [6,8], qui explique leur appellation de proanthocyanidines, est qu'ils libèrent, à chaud et en présence d'acide, des anthocyanes. Il s'agit de molécules de la famille des flavonoïdes qui sont des pigments et qui ont donc la capacité d'absorber une partie de la lumière visible. Les anthocyanes libérés peuvent être de plusieurs types distincts, dont cyanidine et delphinidine, présentés dans la figure suivante :

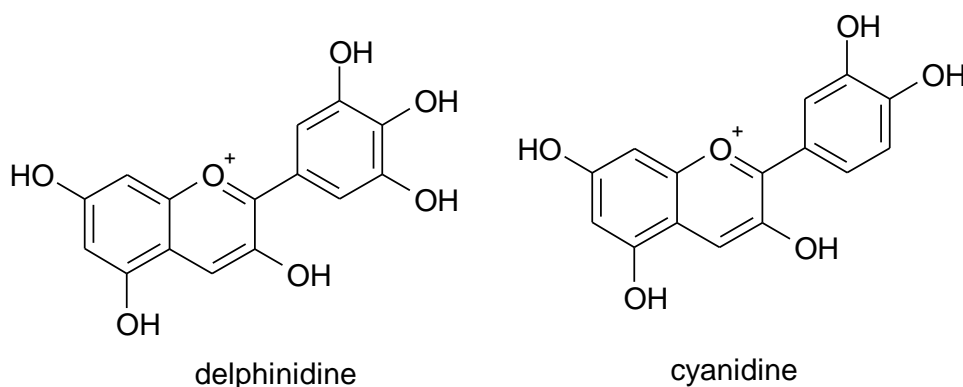


Figure 7 : structure de deux anthocyanes spécifiques, la delphinidine et la cyanidine

Deux types de tanins condensés sont distingués en fonction qu'ils libèrent de la delphinidine ou de la cyanidine. Ils sont appelés respectivement prodelphinidines (polymères de gallocatéchine et d'épigallocatéchine) et procyanidines (polymères de catéchine et d'épicatéchine).

Les unités monomériques se différencient par leurs substituants (acide gallique,...) et leur degré d'oxydation [9,7]. Ces composés jouent un rôle important dans l'amertume de certains aliments ainsi que dans leurs propriétés organoleptiques (thés, vins,...). La figure suivante présente quatre des monomères participant le plus souvent à la formation des tanins :

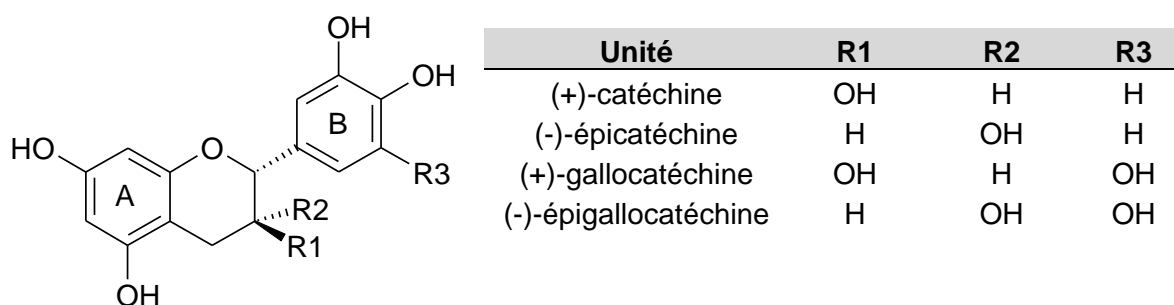
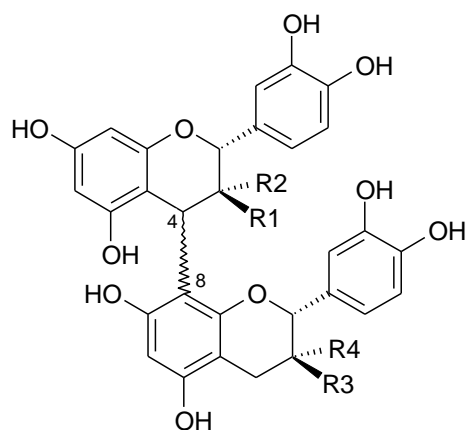


Figure 8 : structure des unités monomériques formant les tanins condensés

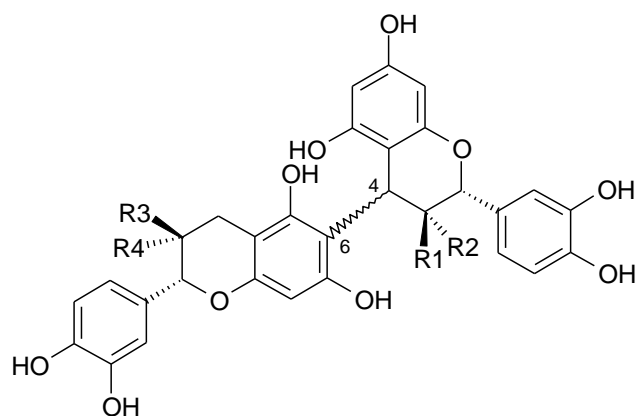
Chaque groupement alcool en R1 ou en R2 de chaque unité peut être substitué par un acide. L'acide le plus commun dans ce genre de substitutions est l'acide gallique.

Les liaisons intermonomères permettent de distinguer deux types de tanins condensés, ceux de type A et ceux de type B [10,11].

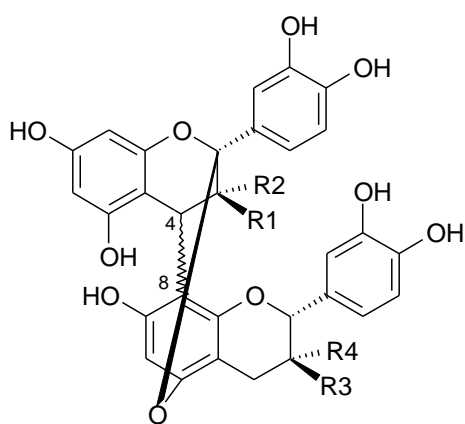
Les tanins de type B sont liés par une liaison C4-C8 ou C4-C6. Chacune de ces liaisons est *anti* par rapport au groupement hydroxyle en C3. Les tanins de type A contiennent, en plus de la liaison de type B, une liaison éther entre le C2 et un groupement hydroxyle sur le carbone 5 ou 7. La figure suivante présente un exemple de chaque dimère, soit deux de type B, un C4-C8 et un C4-C6 ainsi que deux de type A, un C4-C6 et un C4-C8 :



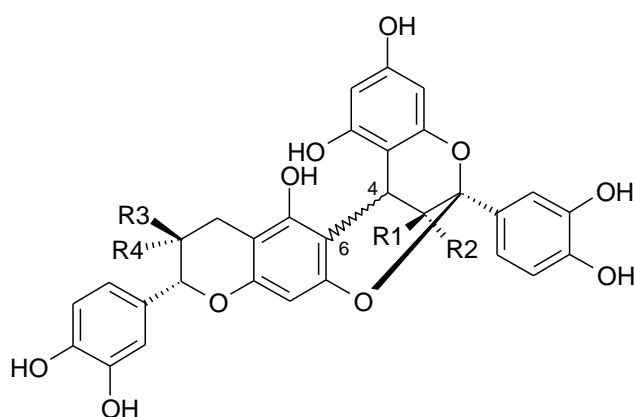
dimère type B [4-8]



dimère type B [4-6]



dimère type A [4-8] [2-O-5]



dimère type A [4-6] [2-O-7]

Figure 9 : diverses liaisons entre monomères dans les tanins de type A et B

Le nombre moyen d'unités de monomère correspond au degré moyen de polymérisation. Chaque molécule va comporter des unités intermédiaires et deux unités en bout de chaîne, ce qui peut faire varier les propriétés de chaque molécule.

De nombreux travaux se sont intéressés aux propriétés biochimiques des tanins condensés. Des propriétés anti-radicalaires et antioxydantes [12] ainsi qu'antitumorales [13] et antivirales [12] ont ainsi été découvertes. C'est ce qui fait l'intérêt de ces molécules. Toutefois, aucune méthode analytique ne permet de déterminer de manière satisfaisante la composition en tanins condensés d'un extrait de plante.

3.3. Méthodes d'extraction et de séparation

Avant de commencer l'analyse des tanins, il faut les extraire de la matrice végétale qui les entoure et qui pourrait interférer avec les analyses. A partir d'ici l'appellation de tanin ne concerne plus que les tanins condensés.

3.3.1. Extraction

Les tanins sont extraits de la plante sèche avec un mélange méthanol acétone eau. Les phases sont réunies, puis l'acétone et le méthanol sont évaporés sous vide. La phase aqueuse est extraite avec de la ligroïne afin d'éliminer les composants apolaires. Le restant de la phase aqueuse est ensuite lyophilisé pour obtenir l'extrait brut [10].

3.3.2. Séparation

Pour obtenir les tanins oligomériques (jusqu'à trois unités), l'extrait brut obtenu en 3.3.1 est déposé sur une colonne de séparation reliée à un détecteur UV [14,23]. Une première élution est effectuée avec une solution éthanol eau afin d'éliminer les acides phénoliques, les anthocyanes et les sucres. Les tanins oligomériques sont ensuite obtenus par élution au méthanol.

Pour les tanins polymériques, le mélange obtenu en 3.3.1 est déposé sur une colonne séparative. Les acides phénoliques et les oligomères sont élués avec une solution méthanol eau, puis la fraction polymérique est récupérée par élution avec un mélange acétone eau. Cette dernière fraction est purifiée sur un gel puis lyophilisée pour finalement devenir une poudre de couleur orange (fraction polymérique) [10].

3.3.3. Fractionnement de la fraction polymérique

La méthode proposée dans ce travail [10] propose de séparer les tanins obtenus en 3.3.1. en fonction de leur degré de polymérisation moyen de deux manières différentes : soit sur silice soit sur résine adsorbante poreuse en éluant avec un gradient croissant de méthanol et de chloroforme et en récoltant les fractions.

Les fractions obtenues sont mieux séparées sur résine que sur silice; le degré de polymérisation est croissant pour chaque fraction [10], ce qui n'est pas le cas de la silice.

3.4. Méthodes de préparation d'échantillon

Les échantillons obtenus au point 3.3, de même que les fractions doivent ensuite subir une préparation avant de pouvoir être analysés. Ce sont ces diverses méthodes de préparation d'échantillon qui sont présentées dans les paragraphes suivants.

3.4.1. Hydrolyse acide – HCl et butanol

Cette méthode [15,16,17,18,27] consiste en une dépolymérisation oxydante des tanins qui forme des anthocyanes, catalysée par HCl. Ces anthocyanes sont colorés, ce qui permet une quantification des tanins par spectrométrie ($\lambda = 550 \text{ nm}$). Toutefois certains facteurs peuvent influencer les résultats de ce test.

La teneur en eau peut faire varier le rendement de la réaction [15]. Toutefois, le test est assez sensible pour donner des résultats acceptables si tous les échantillons contiennent la même teneur en eau.

Le type des liaisons inter monomères n'ont pas toutes la même énergie de liaison. Les liaisons 4-6 sont plus résistantes que les liaisons 4-8. Une quantité de tanins liés 4-6 ne formera pas la même quantité d'anthocyanes que ceux liés 4-8.

Le nombre de groupements alcool sur les cycles A et B change le maximum d'absorption de l'anthocyane. Les cyanidines ont leur λ_{max} à 545 nm tandis que les delphinidines ont leur λ_{max} à 557 nm [19].

Cette méthode est une méthode globale et qui ne donne aucune information sur la composition des tanins. Toutefois c'est un outil indispensable pour la quantification globale des tanins.

3.4.2. Test à la vanilline

Cette méthode, pas vraiment une préparation d'échantillon, [15, 19] consiste à faire réagir les tanins avec de la vanilline pour former des produits colorés pour ensuite quantifier l'extrait par spectrophotométrie. Cette réaction avec la vanilline dépend de beaucoup de facteurs, comme la concentration de vanilline, le pH, la température, le temps d'incubation, la quantité de solvants ainsi que leur qualité. De plus, tous les flavonols présents peuvent réagir, la réaction n'est pas spécifique aux tanins [9]. Il s'agit aussi d'une méthode globale d'analyse qui n'indique pas la structure des tanins.

3.4.3. Thiolyse

La thiolyse [19,17,20,16] se rapproche de la méthode de l'hydrolyse acide, à la différence près que le nucléophile utilisé est le toluène- α -thiol et l'acide sert de catalyseur. Les unités d'élongation du tanin seront donc libérées sous forme de dérivés benzylthioéther, tandis que l'unité terminale est libérée sous forme de monomère libre. L'équation globale est présentée dans la figure suivante :

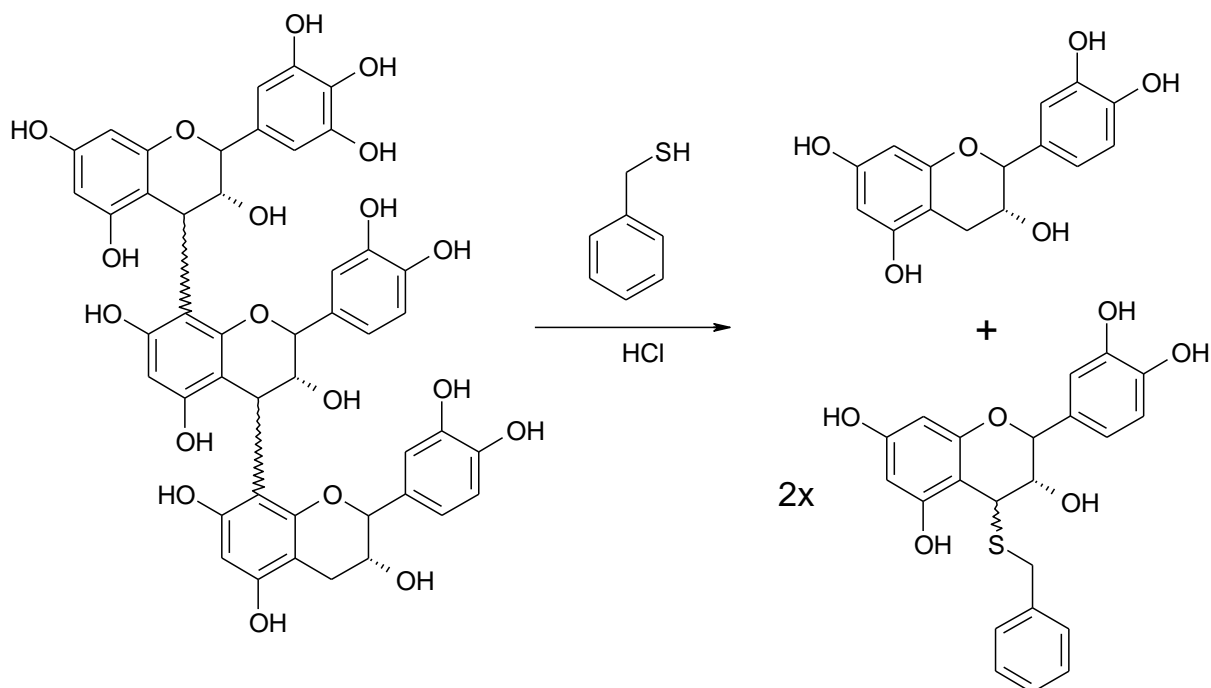


Figure 10 : fractionnement d'un trimère par thiolyse

Les produits de décomposition des tanins peuvent ensuite être analysés par HPLC-UV/ESI-MS [23] et le degré moyen de polymérisation peut être calculé. Il s'agit du rapport du nombre d'unités totales sur le nombre de monomères.

Le fait de travailler avec du toluène- α -thiol, composé toxique et lacrymogène a donné naissance à une méthode identique mais remplaçant ce composé par du phloroglucinol (benzène-1,3,5-triol). Toutefois le rendement de cette réaction d'hydrolyse est bien inférieur à celui obtenu avec le toluène- α -thiol [15].

Deux avantages de cette méthode sont de permettre de calculer le degré de polymérisation ainsi que d'être moins dépendant de nombreux facteurs comme l'hydrolyse HCl-butanol [18]. Il s'agit donc d'une méthode de choix si elle est couplée avec une analyse par HPLC-UV/ESI-MS, puisqu'elle permet aussi de déterminer quelle sont la quantité et la nature de chaque monomère en bout de chaîne.

3.4.4. Hydrolyse enzymatique

Il existe une enzyme appelée *tannase*, provenant d'un champignon (*Aspergillus oryzae*) qui, dans des conditions données, permet l'hydrolyse des tanins [3,10]. L'avantage de la méthode sur l'hydrolyse acide est que le rendement d'une réaction enzymatique est très robuste dans des conditions données, toutefois ces conditions sont tellement spécifiques qu'il est très difficile de les reproduire d'un essai à l'autre.

La littérature [10,3] n'indique pas s'il existe des enzymes qui seraient spécifiques pour la coupure de chaque type de liaison ou pour la coupure après une séquence déterminée de monomères. Une recherche dans ce domaine pourrait être une piste intéressante à suivre.

D'autres enzymes peuvent être utilisées à d'autres fins, en complément d'autres méthodes. En effet, de nombreuses enzymes permettent l'hydrolyse du glucose et des autres sucres qui peuvent être liés aux tanins par l'intermédiaire de l'acide gallique, ainsi que des protéines qui sont connues pour se fixer aux tanins.

3.4.5. Méthodes de précipitation

Il existe des substances qui précipitent spécifiquement les tanins. L'ytterbium [19] a par exemple été utilisé pour précipiter spécifiquement les tanins dans le but d'obtenir des standards pour des tests d'hydrolyse HCl-butanol. Les résultats obtenus coïncidaient avec les autres tests effectués. Il a donc été conclu que la précipitation à l'ytterbium était quantitative pour les tanins [15].

Les cendres du précipité obtenu, après calcination à 800°C, permettent de calculer la quantité de tanins, mais n'indiquent pas la structure du polymère ni les monomères constitutifs.

Une précipitation au polyéthylène glycol (PEG) existe aussi [19,3]. Cette méthode présente un avantage considérable. En effet, le PEG a une plus grande affinité que les protéines pour les tanins, il va donc former des complexes stables avec les tanins en cassant ceux formés par les protéines. Si du PEG comportant du carbone 14 est utilisé, une localisation et une quantification *in situ* des tanins peut être effectuée. Cette méthode ne donne pas la séquence des monomères et présente des risques de par l'utilisation de matériel radioactif.

3.5. Méthodes d'analyse

3.5.1. HPLC-UV/MS

La méthode la plus utilisée pour caractériser les extraits de tanins obtenus par une méthode de préparation d'échantillon est l'analyse par chromatographie liquide haute pression [21,14] (HPLC) couplée à un détecteur UV et/ou un spectromètre de masse avec ionisation ESI [23]. Ces deux détecteurs permettent d'une part (UV) une analyse quantitative rapide et d'autre part (MS) une identification précise des molécules. Une méthode existe déjà qui permet d'analyser les monomères et quelques dimères [17].

Une autre méthode [30,10] est décrite comme permettant une séparation des tanins en fonction du nombre de monomères constitutifs, la méthode est une chromatographie en phase normale. Ce genre de chromatographie dépend énormément de la teneur en eau de chaque solvant, de la phase stationnaire utilisée et d'autres paramètres, ainsi certaines séparations sont très difficiles à reproduire.

3.5.2. Spectrométrie de masse

Il existe de nombreuses méthodes d'analyse des tanins par spectrométrie de masse. Parmi les plus utilisées, on compte le spectromètre de masse seul couplé à une chromatographie liquide avec une ionisation électrospray [16,11], le MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight) ainsi que le MS/MS. L'avantage du MALDI-TOF [24,11,25] est qu'un produit solide (une préparation est toutefois nécessaire) peut y être injecté, de plus, il permet l'analyse de molécules ayant une grande masse molaire. Le MALDI-TOF [25] propose aussi une possibilité très intéressante de déterminer pour chaque polymère détecté les masses de décomposition de ce polymère et donc les monomères constitutifs. Toutefois un tel système n'est pas présent dans de nombreux laboratoires et n'est pas facile à mettre en place. Il reste néanmoins une piste intéressante.

3.5.3. H-RMN/C-RMN

Dans le cas où une fraction pure d'un tanin peut être isolée, la RMN du proton ou du carbone permet une analyse précise de la structure de la molécule [31]. La séquence des monomères peut aussi être déterminée par une analyse précise du spectre.

Cette méthode n'est toutefois pas optimale. En effet, la RMN est une excellente méthode d'analyse des petites molécules, pour d'immenses polymères, l'interprétation devient délicate et prend énormément de temps.

3.5.4. Electrophorèse capillaire

Une méthode d'électrophorèse capillaire existe [28] déjà pour quantifier les catéchines dans des extraits végétaux, quelques modifications de cette méthode pourraient permettre de séparer les tanins par électrophorèse ou de révéler des informations difficilement ostensibles par de la chromatographie liquide. De plus, la grande capacité de séparation de cette méthode peut permettre de séparer certains composés qui ne le seraient pas avec une chromatographie liquide.

3.5.5. Tests biologiques

Les tanins ont une importante activité biologique, ils peuvent aussi avoir des effets inhibiteurs de certaines enzymes (β -glucosidase, trypsine, amylase, cellulase et phosphatase alcaline), des propriétés faisant précipiter des protéines [22] ou encore des effets inhibiteurs de croissance microbienne [22]. Une batterie de tests a été mise en place en se basant sur ces phénomènes.

L'avantage de cette méthode est de permettre une grande sensibilité puisque l'enzyme permet d'amplifier l'effet mesuré.

Seuls des effets globaux d'inhibition de protéines par les tanins sont développés à ce jour, sans qu'un rapport entre une séquence donnée de monomère et la protéine inhibée ne soit utilisé. Toutefois une étude de cette inhibition par des parties ou des tanins spécifiques pourrait être intéressante.

4. Définition d'une matrice d'analyse

L'analyse des tanins n'est pas encore optimisée, ni sur le point de l'extraction, ni de la préparation d'échantillons. Il n'y a pas de méthode universelle, toutefois, au vu des points précédents, une liste d'opérations à effectuer peut être déterminée, ainsi qu'une liste des pistes où une recherche pourrait s'avérer intéressante.

La difficulté d'obtenir une bonne reproductibilité avec les tests biologiques fait de la méthode HPLC-UV/MS la méthode de choix pour analyser les extraits, une ou plusieurs préparations préalables suffisant à avoir un échantillon analysable et des résultats exploitables par une méthode simple. Toutefois, au vu du nombre de polymères différents existants, un chromatogramme ne pourra en aucun cas permettre de quantifier et qualifier la composition en tanins d'un extrait.

La première information à déterminer est la quantité de tanins présents dans l'extrait à analyser. Cette information sera obtenue par hydrolyse acide des tanins et mesure spectrophotométrique. Dès lors, la composition de ces tanins devra être élucidée par d'autres préparations d'échantillons.

Les méthodes de préparation d'échantillon retenues sont donc la thiolysse qui permet de calculer le degré de polymérisation moyen mais aussi la quantité de chaque monomère dans les tanins. Des hydrolyses enzymatiques des sucres et des protéines pouvant être liés aux tanins seront testés pour déterminer si elles sont utiles pour une meilleure détection.

Pour les fractions ayant un haut degré de polymérisation, l'analyse par MALDI-TOF est envisageable, les hydrolyses étant certainement moins efficaces sur de grandes molécules, et l'appareil bien adapté aux molécules de poids moléculaire supérieur à 2000 Dalton.

Les différentes préparations d'échantillons seront effectuées en parallèle afin de comparer les qualités et les défauts de chaque méthode. De plus, les échantillons seront traités ou non avec des enzymes hydrolysant les sucres et les protéines, afin de déterminer si l'hydrolyse acide suffit à les éliminer. L'efficacité de ces enzymes est aussi à déterminer. Il faudra aussi déterminer si les propriétés des tanins faisant précipiter les protéines vont nuire à ces analyses.

Plusieurs pistes de recherche peuvent être explorées. Il s'agit d'une part de la recherche d'enzymes qui coupent les polymères sélectivement après une séquence de monomères déterminée et d'autre part de protéines qui sont précipitées sélectivement ou d'enzymes inhibés sélectivement par certaines séquences de monomères ou par des tanins particuliers. De telles méthodes pourraient permettre une analyse plus spécifique qu'une simple analyse des monomères constitutifs des tanins. Toutefois, une telle recherche demande énormément de temps et d'argent.

Une modification de la méthode d'électrophorèse capillaire déjà existante pour séparer les catéchines permettrait peut-être de séparer certains tanins grâce à la capacité de séparation de la méthode. Il s'agit ici d'une piste de recherche intéressante.

Etant donné la très grande complexité des tanins et le nombre élevé de possibilités de polymères existants (4 monomères, galloylés ou non, 4 possibilités de liaison) ce travail va faire subir à l'échantillon différentes opérations et les différences après chaque préparation

vont permettre de tirer des conclusions, qui, mises bout-à-bout vont permettre d'avoir un bon aperçu global de la composition en tanins de la plante.

L'analyse comportera donc une extraction pour mettre les composés recherchés en solution, puis un lavage de cette solution pour éliminer les composés qui ne sont pas intéressants pour ce travail. Ensuite une quantification globale des tanins sera effectuée par hydrolyse HCl-butanol. La fraction de chaque monomère dans les tanins en tant qu'unité terminale ou unité d'élongation ainsi que le degré de polymérisation moyen sont déterminés par thiolysse, réaction qui sera aussi étudiée au niveau de son rendement puisqu'elle donne des informations importantes. Des hydrolyses enzymatiques seront effectuées sur l'échantillon pour voir si la présence de sucres ou de protéines peut fausser les analyses.

D'autres essais comme la chromatographie en phase normale ou l'électrophorèse capillaire seront testés et exploités en cas de résultats concluants.

Lors du passage à la pratique de nombreux points devront être réglés, comme l'adaptation de certains modes opératoires au matériel disponible dans le laboratoire, tenir compte des rendements des hydrolyses, la séparation de l'enzyme du reste de l'échantillon après hydrolyse, etc.

L'esparcette est la plante sur laquelle sera effectué ce travail et est brièvement présentée dans le chapitre suivant.

5. *Onobrychis viciifolia* Scop.

La plante d'intérêt pour ce travail est *Onobrychis viciifolia* Scop., aussi appelé sainfoin ou esparcette. C'est une plante commune de la famille des fabacées. Son nom vient du grec onos (âne) et bruchein (braire), qui indique que la plante était recherchée par le bétail et particulièrement les ânes. D'ailleurs, cette plante est cultivée pour servir de fourrage au bétail depuis plusieurs millénaires.

D'un point de vue botanique [26], le sainfoin est une plante herbacée vivace, glabre ou subglabre mesurant de 30 à 80 cm. Sa tige est mince, dressée à ascendante, simple ou peu ramifiée dans le haut. Les feuilles sont alternées, imparipennées entre 6 et 14 paires de folioles entières, oblongues ou linéaires. Les fleurs sont en longs épis axillaires ; le calice a 5 dents linéaires 2 à 3 fois plus longues que le tube, munies sur les bords de longs poils étalés et la corolle est rose et striée de pourpre. La plante pousse entre mai et août, dans les régions de plaine, les prairies et les champs sur sol calcaire.

La figure ci-après présente une vue de la plante et de la fleur :



Figure 11 : photo d'esparcette (fleur, tige et feuilles)

Ce qui fait l'intérêt du sainfoin pour ce travail ne tient pas dans sa description botanique, mais dans sa composition chimique, puisqu'il présente une certaine quantité de tanins.

Plusieurs études [1] [2] se sont penchées sur la détermination des tanins dans l'esparcette, toutefois, les résultats entre elles ne concordent pas. L'une [1] a montré qu'il n'y a de la catéchine qu'en unité terminale des polymères, tandis que l'autre [2] montre que l'épigallocatechine gallate n'est qu'une unité d'extension du polymère et jamais une unité terminale. Une étude [2] s'est penchée sur plusieurs espèces d'*Onobrychis* et a déterminé une variation du taux de chaque monomère allant jusqu'à 8% entre deux espèces de même qu'entre une même espèce cultivée en deux endroits différents. Les deux études s'accordent sur le fait que le degré de polymérisation moyen se trouve entre 5 et 8 unités.

6. Résultats et discussion

6.1. Analyse HPLC-MS d'un extrait

Une première analyse a été menée sur l'extrait de sainfoin obtenu selon le protocole présenté en annexe 2 afin de vérifier si la méthode HPLC-UV-MS permet de détecter les substances d'intérêt ainsi que de déterminer les composés détectables dans le mélange. Le chromatogramme UV (280nm) est présenté dans la figure suivante :

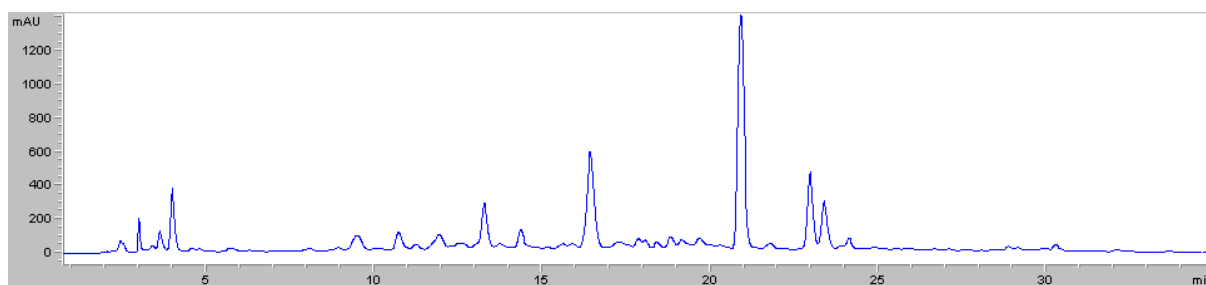


Figure 12 : chromatogramme UV (280nm) de l'extrait de sainfoin

Le spectre UV est chargé de nombreux pics, non identifiables en l'état des choses, toutefois la recherche d'ions spécifiques sur le chromatogramme MS indique les composés présents. La présence de pics recherchés confirme la présence des substances suivantes : catéchine et épicatechine ($m/z = 289$), catéchine gallate et épicatechine gallate ($m/z = 441$), gallocatéchine et épigallocatéchine ($m/z = 305$), gallocatéchine gallate et épigallocatéchine gallate ($m/z = 457$), de dimères de type A et B ainsi que de trimères de type B ($m/z = 575$, 577 et 865). La recherche de tétramères ainsi que de monomères autres que ceux cités ci-avant ($m/z = 273$, 257 et $1153-1155$) n'a pas abouti. Les chromatogrammes correspondants sont répertoriés en annexe 4. Ces composés sont donc soit non détectables avec la méthode utilisée, soit présents en trop faible quantité dans l'extrait analysé. Le fait que les tétramères ne soient pas détectés provient certainement du fait qu'il s'agit de grosses molécules et qu'elles sont donc difficilement ionisées dans le mélange.

La comparaison des spectres UV et MS indique que les composés détectés en MS n'absorbent que peu en UV à 280 nm, en comparaison avec les composés qui forment les pics les plus importants du chromatogramme. Toutefois, un zoom sur la base du spectre montre qu'un groupe de substances est élué entre 10 et 40 minutes en formant une surélévation de la ligne de base, ce qui est caractéristique des tanins [10,11]. En effet, une

comparaison avec un extrait de raisin contenant des tanins présente la même surélévation de la ligne de base, caractéristique des tanins, ce qui est présenté dans la figure suivante :

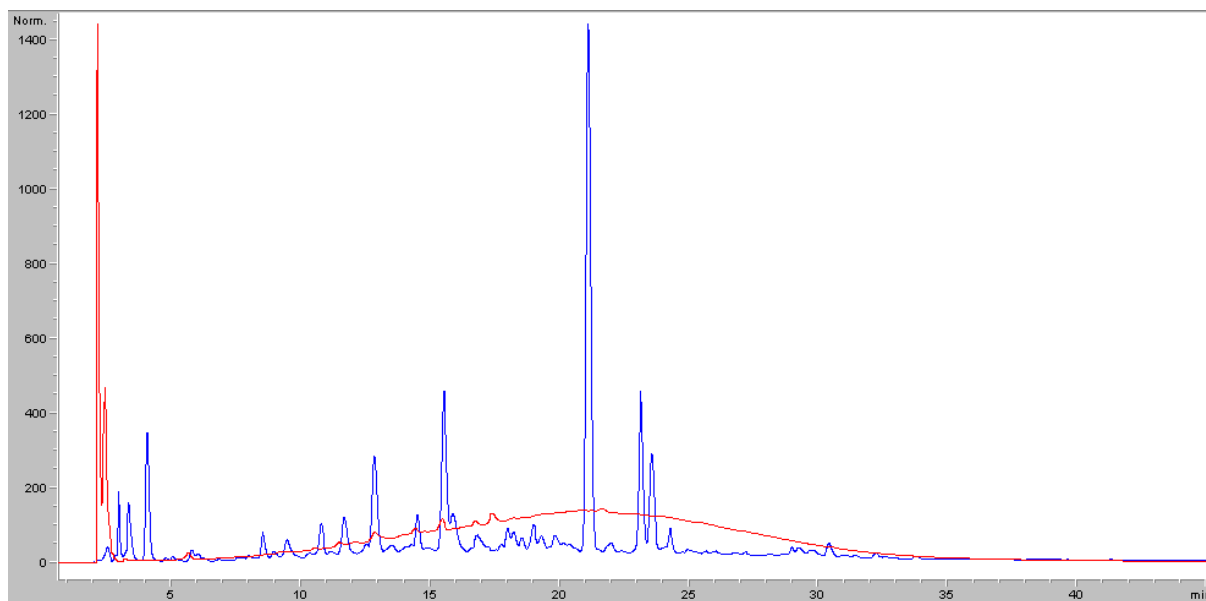


Figure 13 : surélévation de la ligne de base caractéristique des tanins dans un extrait de sainfoin et un extrait de raisin

L'analyse préalable indique donc que les tanins et les monomères sont bien présents dans l'extrait mais ne sont pas détectables, lors de l'élution, à cause de la présence d'autres pics de substances avec lesquelles ils coéluent. L'extrait ne doit donc pas contenir beaucoup de tanins et les méthodes ultérieurement utilisées (toutes testées sur du raisin) devront tenir compte de cette faible teneur. L'extrait de raisin est beaucoup plus concentré en tanins, ce qui explique pourquoi ceux-ci ne sont pas cachés sous d'autres pics. Les analyses HPLC ultérieures devront donc être effectuées et interprétées à l'aide du spectre de masse en recherchant les ions correspondant aux m/z des composés à analyser ou alors en purifiant l'extrait pour augmenter sa teneur en tanins.

Avant de purifier l'extrait, sa teneur en tanins et une caractérisation de ceux-ci par d'autres méthodes est effectuée.

6.2. Quantification

Pour quantifier les monomères libres et ceux libérés par la thiolyse, deux courbes de calibration ont été réalisées avec de la catéchine et de l'épicatéchine. Pour chacun des deux composés, la droite de calibration est réalisée avec les nombre de counts de la trace m/z de la molécule sur le spectre de masse. Ceci pour la simple raison que les composés détectés par leur trace m/z au point 6.1 ne sont pas visibles sur le chromatogramme UV.

Les courbes de calibration du deuxième degré sont tracées à l'aide de 8 points en faisant en sorte que les aires trouvées pour les monomères en 6.1 se trouvent au milieu de la plage utilisée. Les deux droites sont présentées dans la figure suivante :

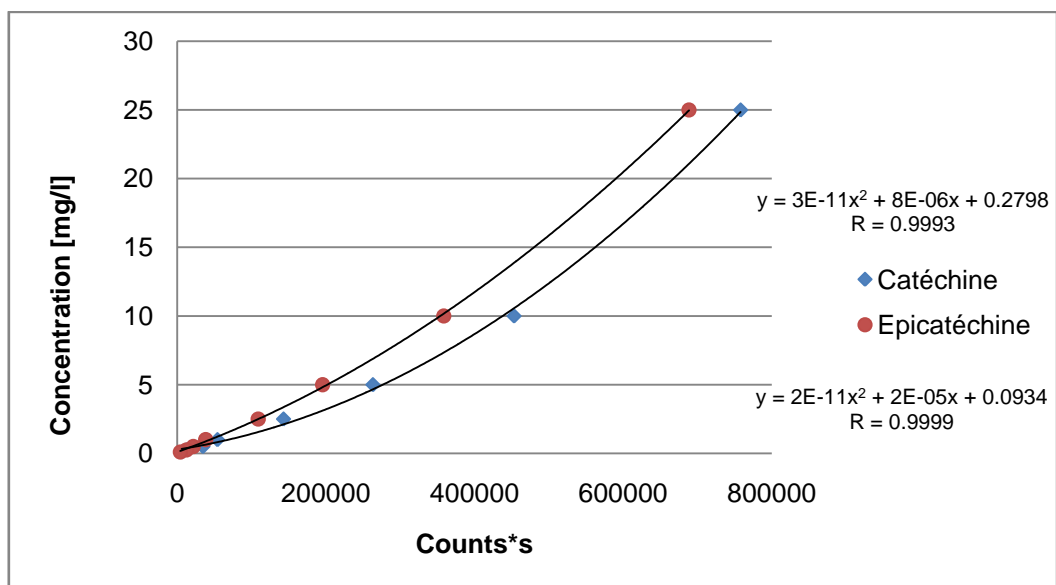


Figure 14 : courbes de calibration de la catéchine et de l'épicatéchine

Cette méthode de quantification permet de pallier la séparation imparfaite de la méthode HPLC en permettant de doser un composé en extrayant sa masse molaire du chromatogramme MS. La valeur proche de 1 des coefficients de corrélation prouve que l'ordre deux de la courbe est une bonne appréciation du comportement des points.

Ces deux droites seront donc utilisées tout au long de l'interprétation des résultats ci-après pour chaque quantification.

6.3. Hydrolyse acide butanol

Cette méthode (protocole en annexe 2) permet une quantification globale des tanins dans un extrait. La mesure des anthocyanes formés lors de la dépolymérisation des tanins en milieu acide par spectrométrie d'un standard permet de faire une calibration puis de doser les tanins dans un extrait.

Ici, l'absence de standards purs de tanins a été contournée par l'utilisation de l'extrait de raisin comme standard. La pureté de cet extrait est estimée par HPLC-UV et par électrophorèse capillaire (voir 6.7) à une valeur de 90%. Une droite de calibration est alors réalisée avec cet extrait de raisin et est présentée dans la figure suivante :

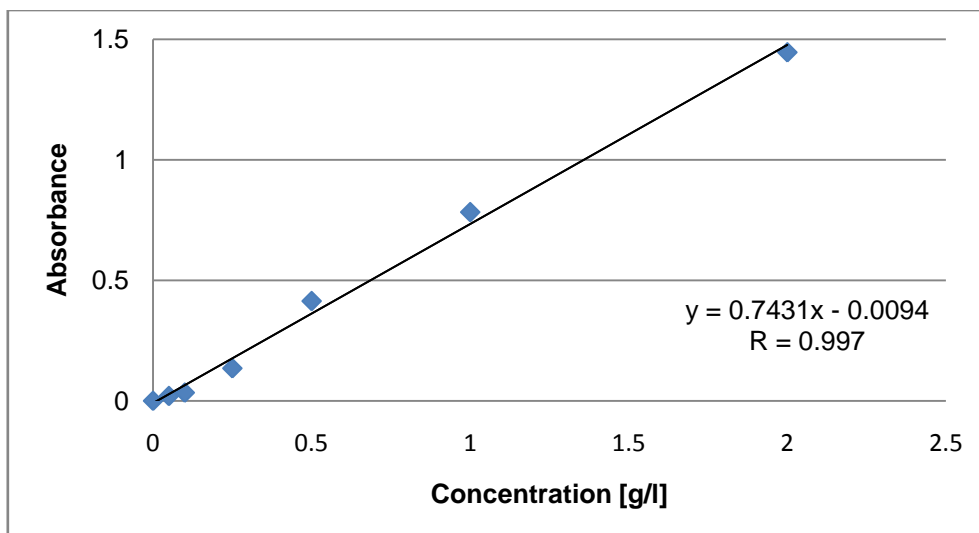


Figure 15 : calibration du test HCl-butanol avec extrait de raisin

L'axe de l'absorbance monte jusqu'à une valeur de 1.5, mais comme la linéarité est conservée et que le coefficient de corrélation est proche de 1, ce point est conservé.

Les extraits de sainfoin obtenus selon le protocole « épuisement » en annexe 2 sont analysés par cette méthode, à triple. Ceci permet de déterminer la quantité de tanins extractibles dans la plante pour chaque épuisement. Les résultats sont présentés dans la figure suivante :

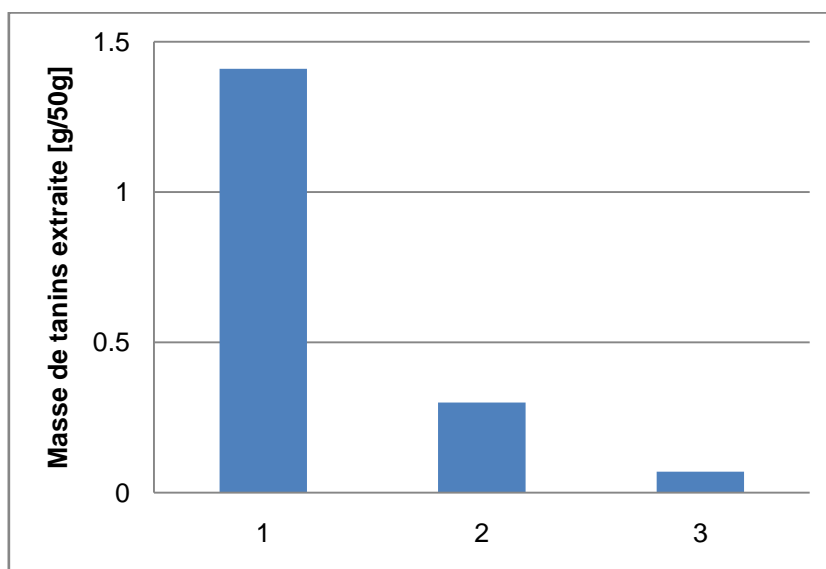


Figure 16 : épuisement de la masse de tanins du sainfoin pour chaque extraction

Par extrapolation, les masses extraites à la quatrième extraction, puis à la cinquième peuvent être calculées et en les additionnant, la quantité totale de tanins extractibles de la plante peut être obtenue. Cette valeur se monte à 1.8 grammes pour 50 grammes de plante au départ, ce qui correspond à 3.55% du poids de plante sèche.

Chaque essai ayant été fait trois fois, un calcul de l'erreur peut être effectué sur la base des valeurs obtenues (fiche de calcul en annexe 3). L'erreur obtenue sur les mesures est inférieure à 6%.

Le test a aussi permis de déterminer le pourcentage massique de tanins dans les lyophilisats obtenus pour chaque épuisement. Le premier épuisement a donc une teneur de 16.5%, le deuxième de 10.5% et le troisième de 8.5%.

La réaction d'hydrolyse des tanins en milieu acide est donc une bonne méthode pour avoir rapidement une quantification globale de la teneur en tanins de l'échantillon. La reproductibilité de la méthode est bonne ; elle sera donc utilisée ultérieurement lors des quantifications d'extraits purifiés.

6.4. Thiolyse

Après avoir été thiolysé selon la méthode décrite en annexe 2 et analysé par HPLC-UV-MS, l'échantillon présente sur le chromatogramme une diminution de la bosse d'élution due aux tanins avant hydrolyse et présente de nouveaux pics, comme le présente la figure suivante:

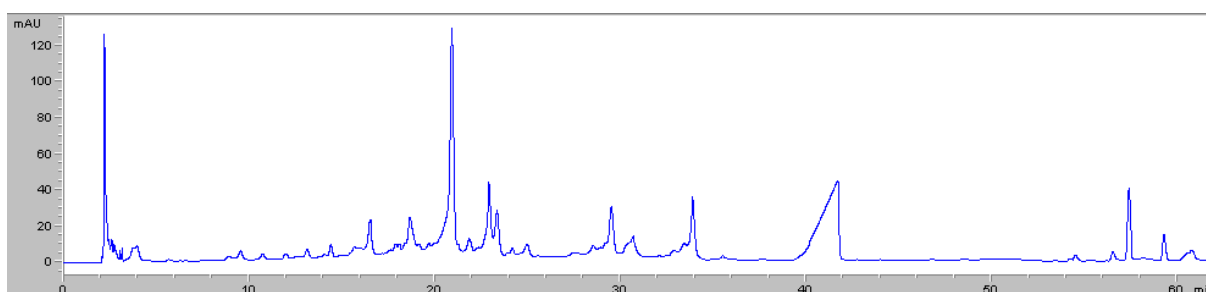


Figure 17 : extrait de sainfoin après thiolyse

La faible quantité de tanins présents dans l'échantillon ne permet pas d'avoir un résultat visuel frappant, toutefois de nouveaux pics apparaissent en UV, l'un étant le benzyl mercaptan (41min) et les autres (29min, 34min), correspondant aux dérivés thioéther des monomères constituant les unités d'élongation des tanins. L'absorbance élevée à 280 nm de ces pics est due au fait que le benzyl mercaptan absorbe à cette longueur d'onde. Les pics des dérivés thioéther sont larges et trop mal définis pour pouvoir différencier la catéchine de l'épicatéchine et la gallocatéchine de l'épigallocatéchine, toutefois une quantification globale pour chaque groupe de ces deux composés est réalisable et elle permettra de déterminer la quantité de chaque groupe de monomères comme unités d'élongation dans les tanins.

Les standards des dérivés thiols ainsi que de gallocatéchine et d'épigallocatéchine n'étant pas disponibles, la quantification est faite à partir des courbes de calibration de la catéchine et de l'épicatéchine, l'hypothèse étant faite que les dérivés de ces molécules se comportent de la même façon. Pour affiner la quantification, la synthèse des dérivés thioéther de chaque monomère devrait être effectuée afin de pouvoir quantifier chaque composé avec une calibration effectuée sur le même composé.

La quantité des monomères comme unités d'élongation de l'extrait, et ce pour chaque épuisement, est présentée dans le tableau suivant :

Tableau 1 : pourcentage de chaque monomère en unité d'élongation

Epuisement	Substance	% en élongation
1	C-EC	9.6
	Cg-ECg	0.7
	GC-EGC	87.8
	GCg-EGCg	2.0
2	C-EC	7.7
	Cg-ECg	1.1
	GC-EGC	90.7
	GCg-EGCg	0.5
3	C-EC	6.3
	Cg-ECg	0.8
	GC-EGC	92.4
	GCg-EGCg	0.5

La première constatation est que, pour chaque épuisement, environ 98% des unités d'élongation sont non galloylées et seulement 2% des monomères d'élongation sont liés à des acides galliques. Une autre constatation est que 90% des monomères d'élongation sont de la gallocatéchine ou de l'épigallocatéchine.

Pour affiner la quantification de ces substances, une modification de la méthode de séparation devrait être tentée pour séparer les pics ainsi qu'une calibration UV des dérivés thiols à l'aide de standards, puisque ceux-ci absorbent beaucoup plus en UV que les monomères libres.

Pour ce qui est des monomères présents en unités terminales des polymères, ils sont dosés par leur trace MS et la différence de temps d'élution entre chacun des monomères de même masse est suffisante pour permettre leur distinction. Les monomères terminaux étant libérés sous forme de monomère non modifié, la quantité de monomères présents avant thiolysé doit être soustraite de ce qui est dosé dans l'échantillon après thiolysé. Les résultats (fiche de calcul en annexe 2) sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 2 : pourcentage de chaque monomère en unité terminale

Epuisement	Substance	% en terminal
1	C	25.4
	Cg	0.0
	GC	24.3
	GCg	0.0
	EC	18.9
	ECg	0.0
	EGC	31.5
	EGCg	0.0
2	C	24.6
	Cg	0.0
	GC	25.0
	GCg	0.0
	EC	17.6
	ECg	0.0
	EGC	32.8
	EGCg	0.0
3	C	23.0
	Cg	0.0
	GC	25.1
	GCg	0.0
	EC	25.7
	ECg	0.0
	EGC	26.2
	EGCg	0.0

Parmi les constatations principales, on remarque que les monomères non galloylés sont présents en quantités presque égales, avec un peu plus d'épigallocatechine que d'épicatéchine.

Pour ce qui est des monomères galloylés, qui étaient présents en petites quantités en unités d'élongation, ils sont totalement absents dans les unités terminales. Ceci peut provenir de deux faits différents. Le premier serait que l'addition de l'acide gallique ne se ferait qu'en petite quantité et uniquement sur des unités déjà intégrées dans un polymère. Le deuxième serait que les conditions de la thiolysse fassent se séparer les acides galliques des monomères, mais cette hypothèse peut être écartée, car les acides galliques sont observés sur les unités d'élongation. Ces résultats correspondent avec ceux trouvés dans une publication où seule la moyenne pour toutes les espèces de sainfoin est donnée [2].

Lors de la thiolysse, il se peut que les tanins ne soient pas totalement thiolysés. En effet, la thiolysse d'un tanin à six unités peut donner trois dérivés thioéther et un trimère. Ceci signifie donc que, sans étude complémentaire, le nombre d'unités terminales est quelque peu sous-estimé.

Les quantités de monomères terminaux et d'élongation, déterminés par thiolysé, permettent de calculer le degré de polymérisation moyen des tanins de l'échantillon, puisqu'il correspond à la somme de tous les monomères divisée par la somme de toutes les unités terminales. Les résultats obtenus pour chacun des épuisements sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 3 : degré de polymérisation moyen de chaque épuisement

Epuisement	dPm
1	4.6
2	5.7
3	8.9
total	5.8

Le degré de polymérisation moyen augmente en fonction de l'épuisement, ce qui n'est pas surprenant puisqu'un tanin de grande taille sera plus difficile à extraire qu'un tanin de petite taille.

Le degré de polymérisation total, environ 6, correspond à la moyenne pour tous les tanins extractibles de la plante. Une étude plus approfondie pourrait être menée sur le marc de la plante après l'extraction pour déterminer s'il reste dans celui-ci des tanins de plus grande taille non extraits ou encore des tanins liés à des fibre ou des sucres dans la paroi cellulaire par exemple. Pour ce faire, le marc subirait une hydrolyse HCl-butanol, et si des anthocyanes apparaissent, cela signifie qu'il reste des tanins dans la plante.

La thiolysé a été effectuée sur un extrait de raisin pour déterminer si la réaction a un taux de recouvrement satisfaisant, puisque le chromatogramme du raisin ne présente pas les pics d'autres substances par-dessus les tanins comme c'est le cas pour l'esparcette. Le chromatogramme obtenu (superposé à celui de l'extrait avant thiolysé) est présenté dans la figure suivante :

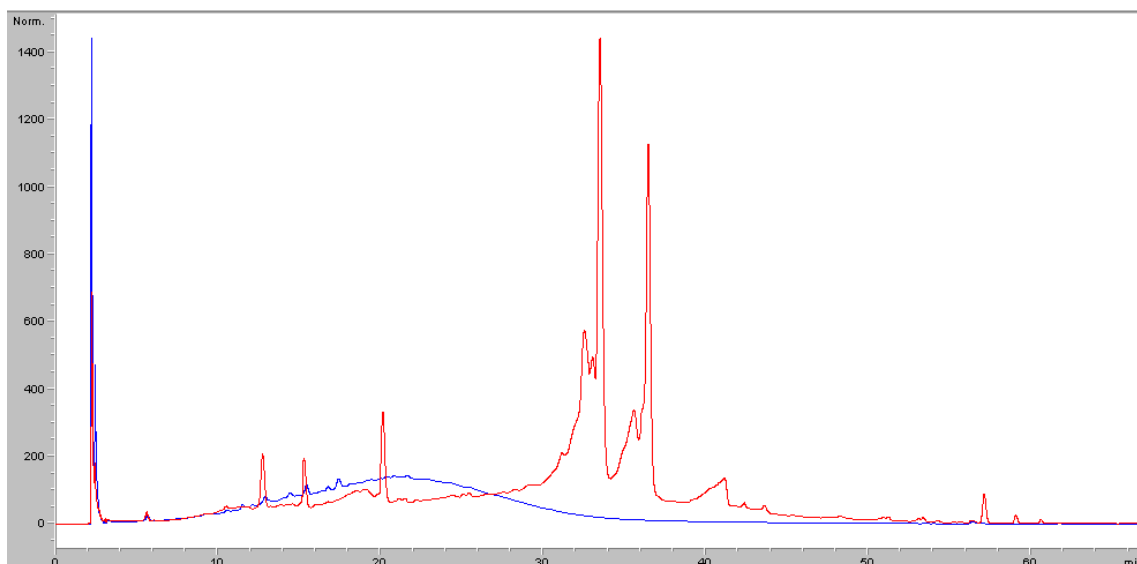


Figure 18 : extrait de raisin avant et après thiolysse

On constate ici qu'environ 60% de l'aire des tanins disparaissent et que des pics des dérivés thioéther apparaissent. Ces 60% correspondent au rendement de la réaction, pour le raisin. Toutefois les tests de sélectivité et de reproductibilité effectués ci-après permettent de dire que cette réaction n'est pas spécifique à la séquence des tanins, la valeur du rendement peut donc être appliquée à tout extrait. On remarque aussi que des pics apparaissent en fin du chromatogramme entre 58 et 65 minutes. Ces pics sont des dérivés d'autres substances phénoliques, compris dans les 10% d'impuretés estimés de l'extrait, qui ont réagi avec le benzyl mercaptan lors de la thiolysse, mais pas des tanins, car leur spectre de masse ($m/z = 346, 348, 344$) ne donne aucun fragment caractéristique des tanins.

Pour contrôler que la thiolysse est une réaction reproductible, trois échantillons de raisin ont été thiolysés en parallèle et leurs trois chromatogrammes superposés sont présentés dans la figure suivante :

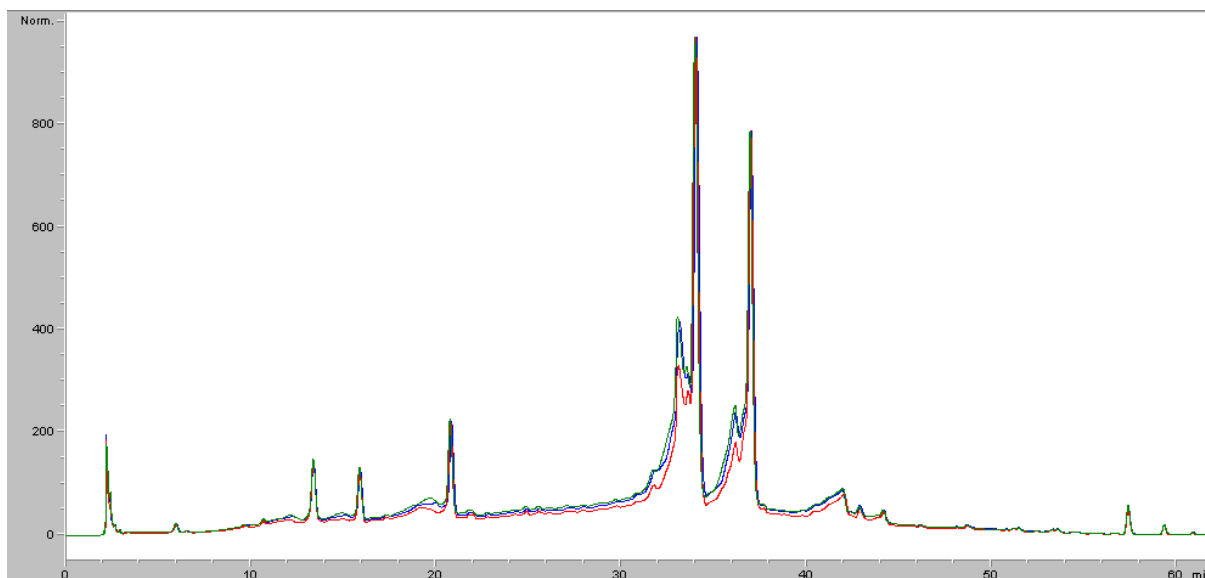


Figure 19 : reproductibilité sur extrait de raisin

Les trois chromatogrammes se superposent parfaitement, ce qui prouve que la thiolysé est reproductible. Notons que l'un des chromatogrammes est un peu inférieur aux deux autres, mais présente le même profil UV que les deux autres chromatogrammes. La diminution est donc due, très probablement, à une concentration plus basse due à une erreur de dilution.

Pour contrôler si des effets de matrice faussent les résultats, une thiolysé d'un échantillon déjà thiolysé a été effectuée. Les résultats obtenus précédemment pour une seule thiolysé sont confirmés, avec quelques petites variations, comme la présence d'environ 2% de catéchine gallate et d'épicatéchine gallate en unités terminales. Puisque l'échantillon est à une concentration plus élevée, la présence de ce 2% d'unités galloylées n'a pas été détectée lors du premier essai car elle était en dessous du seuil de détection.

Les unités d'élongation obtenues après la deuxième thiolysé sont en même quantité relative qu'après la première de même que les unités terminales. Ceci signifie que la réaction de thiolysé n'est pas sélective vis-à-vis des monomères constitutifs des tanins.

Tout ceci prouve que la méthode de thiolysé, bien que n'ayant pas un rendement très élevé est une réaction qui ne varie ni avec le temps ni avec la concentration de l'échantillon ni même avec la composition en monomères. Elle est donc très fiable et les résultats qu'elle permet d'obtenir sont très importants pour déterminer la composition en monomères des tanins.

Pour pousser la méthode encore plus loin, un mécanisme de la réaction de thiolysé peut être postulé. Il se déroulerait de la façon suivante. D'abord, l'acide permettrait de déstabiliser le cycle A qui se stabilise en cassant la liaison inter monomères. Un monomère est libéré dans

sa forme naturelle, tandis que l'autre possède une charge positive qui permettra au benzyl mercaptan de faire une attaque nucléophile. Ceci est illustré dans la figure suivante :

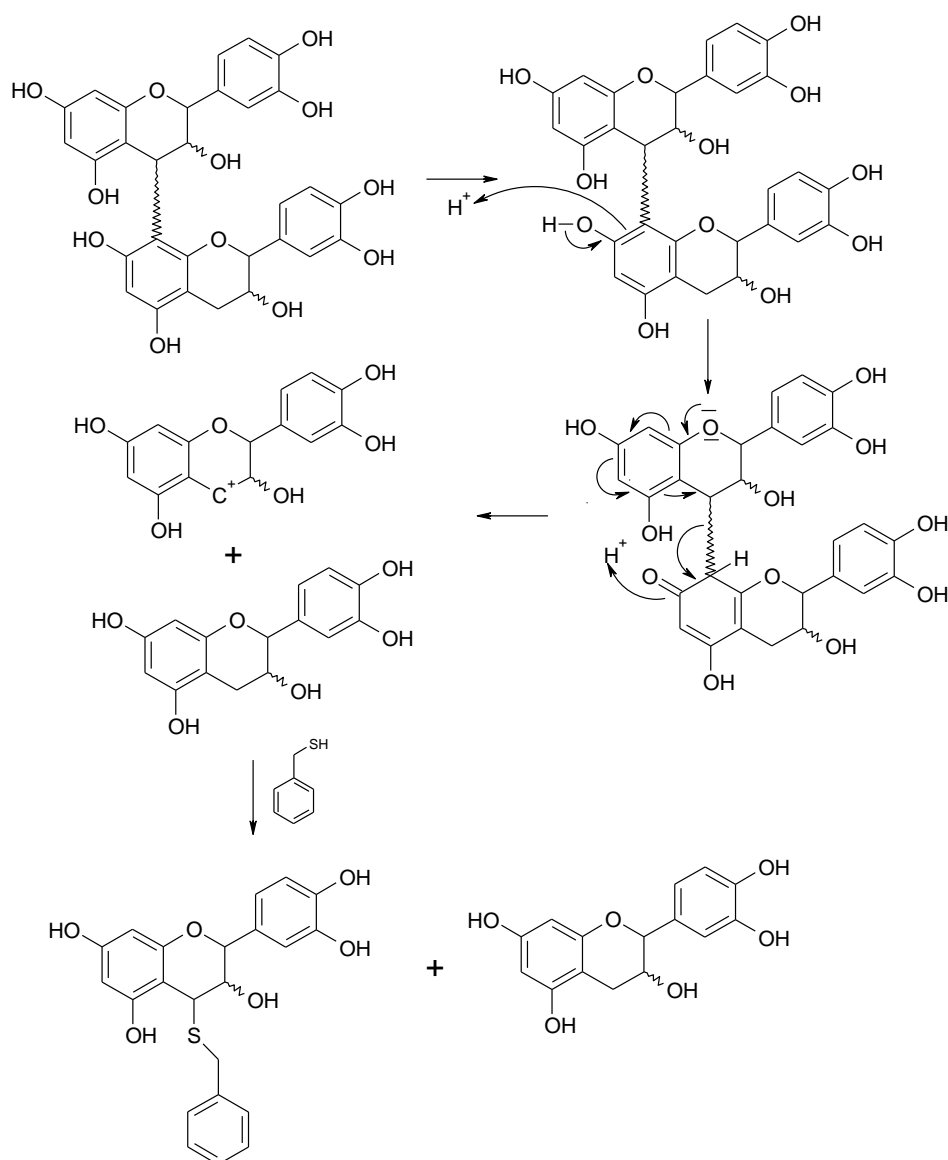


Figure 20 : mécanisme présumé de la thiolyse

Ce mécanisme ne permet pas de dire si oui ou non les tanins de type A sont hydrolysés. Toutefois la liaison éther présente entre les monomères peut être hydrolysée en présence d'acide, ce qui tend à dire qu'ils sont également hydrolysés.

6.5. Précipitation à la gélatine

Le test a été effectué selon le mode opératoire présenté en annexe 2. L'analyse par HPLC-UV-MS ne montre aucune différence entre les extraits avant et après précipitation à la gélatine. Ceci peut être dû à un ajout de gélatine insuffisant, une mauvaise température d'incubation ou encore une inhibition de la précipitation par les substances présentes dans l'échantillon. Pour tenter une précipitation des tanins une autre méthode doit donc être envisagée. Il s'agit de la précipitation à l'ytterbium.

6.6. Précipitation à l'ytterbium

La méthode est présentée en annexe 2. La précipitation à l'ytterbium a été plus efficace que la méthode avec la gélatine, puisqu'un précipité s'est effectivement formé. Pour obtenir plus d'informations sur les substances qui ont précipité, une analyse de l'extrait avant et après précipitation sont effectuées par HPLC-UV :

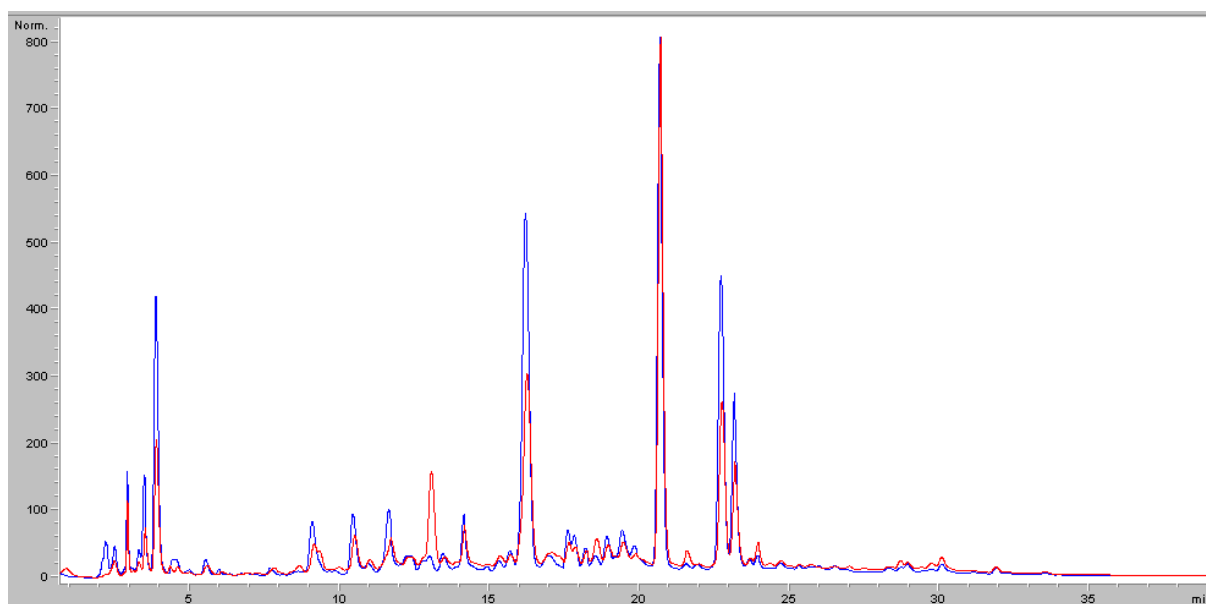


Figure 21 : chromatogramme de l'extrait de sainfoin avant et après précipitation à l'ytterbium

Le principal problème de cette méthode, ainsi que de toutes les méthodes de précipitation est le fait que plusieurs substances à la structure proche des substances à précipiter précipitent aussi. Comme le montre la figure ci-avant, tous les pics présents sur le chromatogramme diminuent après l'ajout d'acétate d'ytterbium, sauf le pic qui apparaît à un temps de rétention de 21 minutes.

Un pic apparaît à un temps de rétention de 13 minutes, il pourrait s'agir d'un composé qui aurait réagi avec l'ion acétate ajouté, ou alors un composé qui aurait changé de structure en milieu basique (du au ion acétate). Son spectre de masse ne donne rien d'exploitable (aucun

pic visible), ce qui tend à dire que la masse du composé est inférieure à la limite de masse scannée par le spectromètre (200uma).

Le fait que plusieurs substances précipitent avec les tanins montre la non sélectivité de la méthode de précipitation qui sera donc abandonnée pour la suite. Elle pourrait être utilisée dans le cas d'un extrait très pur, mais pas dans le cas de l'extrait de sainfoin.

6.7. Electrophorèse capillaire

La méthode présentée en annexe 2 a été développée à partir d'une méthode d'analyse des catéchines. Il ne s'agit pas d'une méthode électrophorétique classique mais d'une électrophorèse capillaire micro-micellaire. La différence provient de la présence de micelles de SDS avec lesquelles les tanins ont une affinité spécifique qui n'est pas la même que d'autre molécules présentes dans l'échantillon et qui permet de séparer les tanins de ces substances. La figure suivante présente deux électrophérogrammes superposés, un de l'extrait de sainfoin et l'autre de l'extrait de raisin :

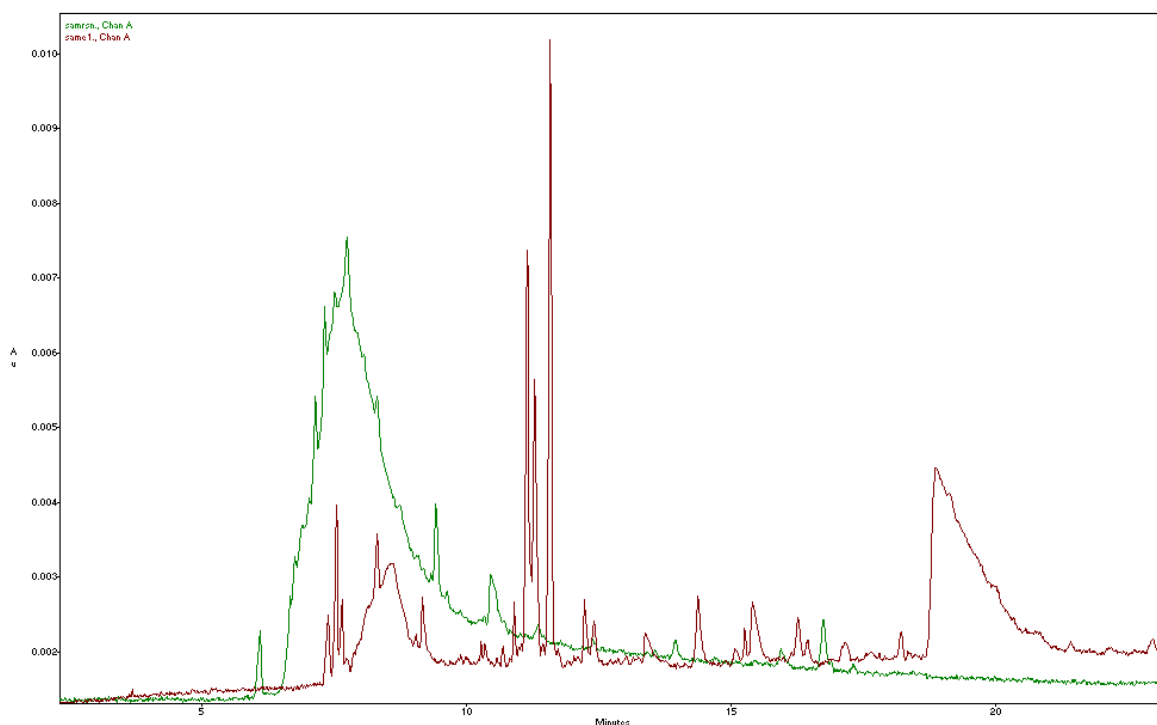


Figure 22 : électrophérogramme des extraits de sainfoin et de raisin

Pour l'extrait de raisin, on constate la même bosse de migration des tanins (5-10 min) qu'avec la méthode HPLC. Toutefois, pour l'extrait de sainfoin, la bosse des tanins est cette fois bien visible et séparée du reste des substances qui se superposaient sur le

chromatogramme HPLC. La séparation est donc meilleure qu'en HPLC. Il reste pourtant quelques substances qui migrent avec un temps proche des tanins. Celles qui migrent plus vite que les tanins sont, selon [29], les monomères. Certains migrent d'ailleurs avec les tanins. Celles qui migrent après les tanins sont des substances parasites. Une tentative d'élimination de ces substances sera effectuée au point 6.8.

D'un point de vue strictement visuel, les électrophérogrammes sont beaucoup plus parlants que les chromatogrammes HPLC-UV, preuve en est la figure suivante qui présente un électrophérogramme de l'extrait de raisin, du premier épuisement et du troisième épuisement, tous à la même concentration :

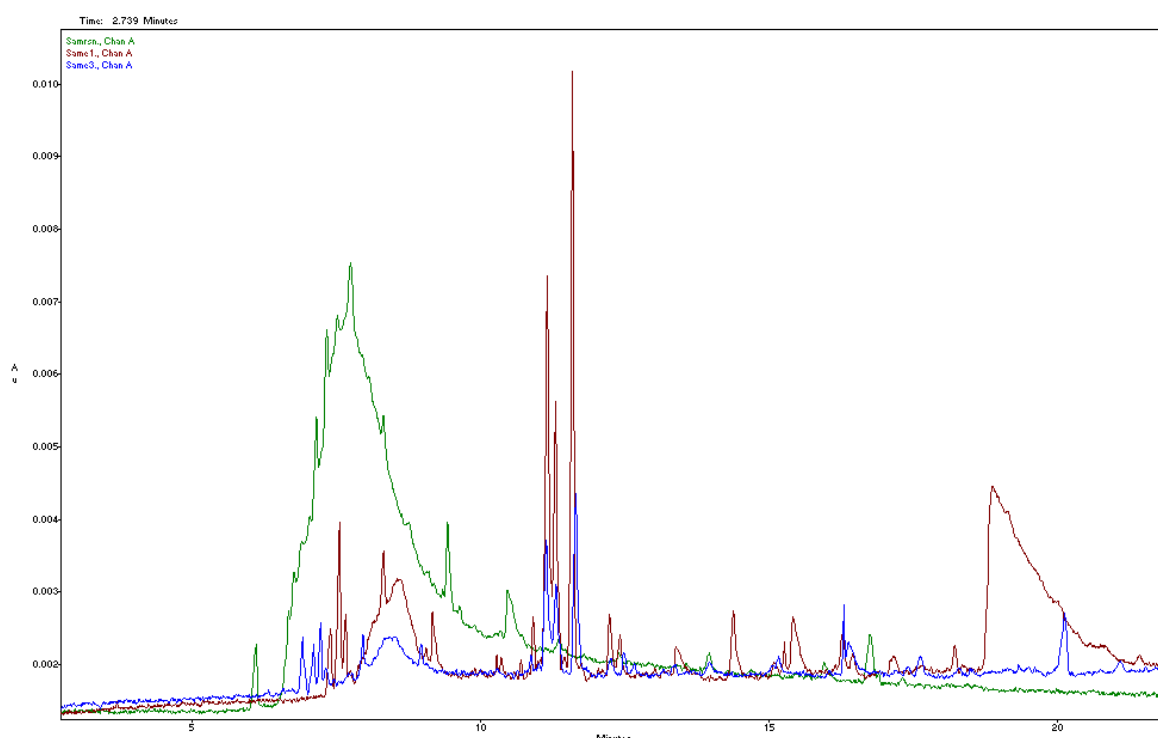


Figure 23 : électrophérogramme d'un extrait de raisin et de deux épuisements du sainfoin (1^{er} et 3^e)

La bosse due à la migration des tanins est très bien visible en début de l'électrophérogramme. La différence en quantité est aussi flagrante, l'extrait de raisin étant beaucoup plus concentré que le premier épuisement, lui-même plus concentré que le troisième épuisement.

L'électrophérogramme suivant présente, pour confirmer, l'extrait de raisin et les standards de catéchine et d'épicatéchine :

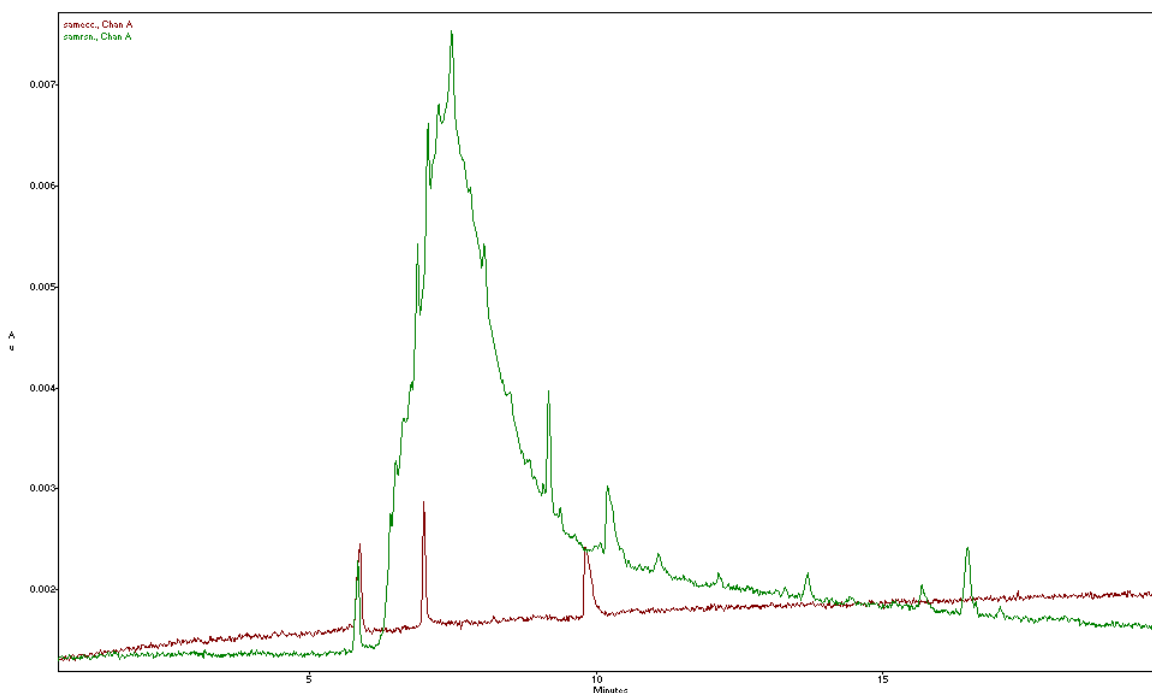


Figure 24 : électrophérogramme d'un extrait de raisin et d'un mélange de catéchine et d'épicatéchine

Conformément aux attentes, les pics des standards migrent en même temps que les tanins, ce qui prouve encore que la bosse observée correspond bien aux tanins. Le pic apparaissant après 10 minutes est un produit de dégradation présent dans le standard d'épicatéchine, celui-ci étant pur à 90% seulement.

Afin de pouvoir profiter au mieux de la bonne séparation offerte par la méthode, un autre détecteur permettrait d'avoir au moins une information sur ces pics mieux séparés (spectre de masse par exemple). Elle est toutefois utile lors de la tentative d'isolation des tanins (6.8.) puisqu'elle permet de voir que de nombreuses substances ont disparu de l'échantillon.

6.8. Fractionnement sur gel

Le fractionnement sur gel a été effectué selon la méthode décrite en annexe 2. Les tanins ont une affinité élevée par rapport au gel utilisé, donc l'élution avec un mélange eau-méthanol permet d'éliminer toutes les substances qui ont une affinité moins grande avec le gel que les tanins qui sont ensuite récupérés par élution à l'acétone. L'analyse HPLC-UV ne permet pas, dans ce cas, de voir des différences entre l'échantillon initial et la fraction obtenue, à cause des pics qui coéluent avec la fraction de tanins.

L'analyse par hydrolyse HCl-butanol indique une concentration de la fraction de 58% massique en tanins contre seulement 16% pour l'échantillon initial. La séparation permet donc d'augmenter la teneur en tanins de l'échantillon initial d'un facteur 4.

L'analyse de la fraction par électrophorèse capillaire indique que certaines substances ont complètement disparu de l'extrait et que les tanins sont désormais isolés des pics parasites sur l'électrophérogramme. La figure suivante présente un électrophérogramme de l'extrait avant et après séparation sur gel :

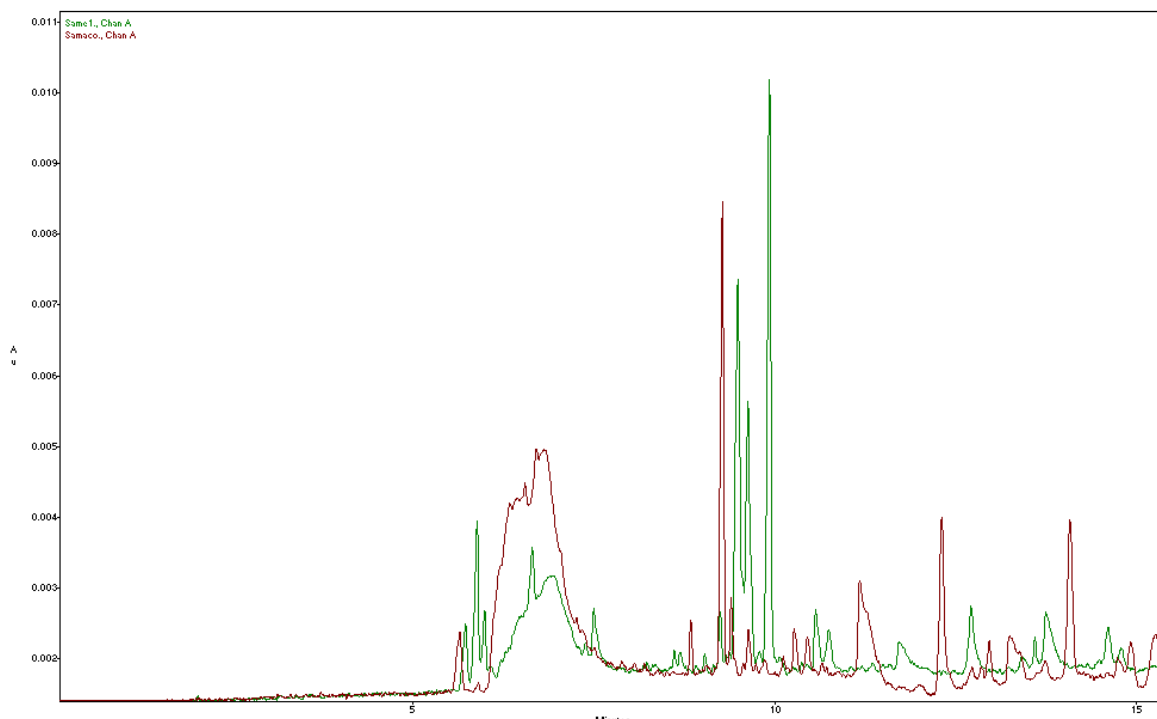


Figure 25 : électrophérogramme d'un extrait de sainfoin avant et après purification

La séparation est donc efficace, mais intervient un peu tard dans le déroulement du travail pour en permettre une utilisation généralisée. Toutefois, pour la suite du travail, une utilisation systématique de cette séparation est recommandée pour d'une part travailler avec un extrait plus concentré en tanins, mais aussi, d'autre part pour travailler avec un extrait plus pur.

6.9. Hydrolyse enzymatique

L'analyse des échantillons de sainfoin après précipitation des tanins avec de la gélatine, selon le mode opératoire présenté en annexe 2, ne donne pas de résultats satisfaisants. En effet, lors de l'addition de l'enzyme à l'échantillon, un précipité se forme dans la solution. L'analyse par HPLC-UV-MS (annexe 4) montre une faible baisse de la ligne de base par rapport à l'échantillon où l'enzyme n'a pas été ajoutée. Ceci indique que certains tanins ont précipité avec l'enzyme et que là où une augmentation du signal était attendue, une diminution de celui-ci est constatée.

Pour pallier ce problème, deux solutions se présentent. La première serait de trouver des enzymes qui ne précipitent pas avec les tanins. La deuxième solution serait de fixer les enzymes sur un support, ce qui empêcherait leur précipitation. Dans cette optique on pourrait envisager de fixer les enzymes sur de la silice et une élution des tanins sur cette silice hydrolyserait les sucres ou les protéines présents.

6.10. Chromatographie phase normale

Une méthode dans la littérature parle de l'analyse des tanins par chromatographie en phase normale [10,30]. Le chromatogramme obtenu est disponible en annexe 4, toutefois, il ne montre rien, même pas une variation de la ligne de base. En zoomant, une tendance de la ligne de base est observable, toutefois cette tendance ne permet de tirer aucune conclusion sur le contenu de l'échantillon.

Le premier problème à s'être présenté a été la différence entre les colonnes proposées dans les publications et la colonne à disposition. Le deuxième est la difficulté à solubiliser l'échantillon dans l'éluant de départ. L'ajout de méthanol augmente la quantité solubilisable, mais cause la précipitation des substances dans l'éluant.

A cause de cela, un échantillon très dilué doit être injecté, ce qui ne permet pas d'observer de façon satisfaisante les pics décrits par la littérature. Pour avoir des résultats probants, il faudrait pouvoir concentrer l'échantillon, ou travailler avec un extrait plus pur.

6.11. RMN-C

L'analyse RMN-C de l'échantillon de sainfoin lyophilisé dissout dans du D₂O a donné le résultat présenté en annexe 4. Etant donné que les analyses préalables ont démontré que l'échantillon contient environ 15% de tanins, cette analyse ne peut permettre que de déterminer la présence de pics caractéristiques des tanins en comparant les déplacements chimiques avec ceux de la littérature [31].

Les pics caractéristiques sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 4 : pics caractéristiques des tanins en RMN-C

δ [ppm]	Attribution
134	1'
76.4	2
69.3	3
29	4

Ces pics correspondent aux carbones caractéristiques des tanins (la numérotation est sur la figure 6) Certains pics, notamment celui correspondant au carbone 2 ne présente aucun pic proche, ce qui est normal, puisque ce carbone tertiaire ne varie pas dans la structure des tanins. Par contre, de nombreux pics entourent celui du carbone 3, qui est un carbone chiral et qui est celui où se lient les acides galliques et autres composés, il est donc normal que dans le mélange de nombreux pics soient observés.

7. Conclusion et perspectives

En définitive, parmi les méthodes testées, l'hydrolyse acide avec HCl a permis de déterminer la teneur en tanins dans les extraits obtenus avec une bonne précision. Cette méthode est donc à conserver, puisque les autres méthodes globales (précipitation à l'ytterbium ou à la gélatine) font aussi réagir d'autres composés présents dans la plante.

La méthode de la thiolysse doit absolument être retenue, car sa robustesse ayant été montrée, elle permet non seulement de déterminer le degré de polymérisation moyen des tanins, mais aussi leur composition en monomères, qui peuvent être différenciés entre ceux terminaux et ceux d'élongation.

La méthode d'électrophorèse capillaire a donné des résultats satisfaisants et permet d'avoir de bons résultats même avec un échantillon peu concentré en tanins.

La RMN ne permet pas de déterminer la structure des tanins si l'échantillon n'est pas pur, mais elle permet toutefois de confirmer ou d'infirmer la présence de tanins dans l'échantillon. Les tentatives de purification sur gel ont abouti à une concentration par un facteur 4 des tanins dans le mélange, ce qui devrait suffire à purifier un extrait déjà relativement riche en proanthocyanidines.

La méthode à utiliser comprend donc une extraction, une purification sur gel de l'échantillon, puis une quantification globale par hydrolyse HCl-butanol. Le degré de polymérisation moyen des tanins et leur composition sont ensuite déterminés par la thiolysse. Si une purification est suffisante, dans le cas d'un échantillon concentré, une RMN du carbone peut être effectuée et analysée pour donner d'autres indications encore ; si l'échantillon est peu concentré, une séparation par méthode électrophorétique est à envisager.

Les perspectives de ce travail sont de pouvoir calibrer le test HCl-butanol avec de vrais standards de tanins purs, plutôt qu'avec du raisin, ainsi que d'améliorer la méthode HPLC pour pouvoir séparer les pics des dérivés thiols des monomères, pour une quantification plus complète. L'essai de la méthode sur d'autres extraits végétaux permettrait de contrôler que la méthode développée ici n'est pas spécifique seulement aux deux échantillons testés.

8. Bibliographie

- [1] Koupai-Abyazani M. et al, "The procyanidin polymers in some species of *Onobrychis* ", Phytochemistry, Vol 34, p. 113-117, 1993.
- [2] Marais J.P.J. et al, "Polyphenols, Condensed Tannins, and Other Natural Products in *Onobrychis Viciifolia*", J. Agric. Food Chem., Vol 48, p. 3440-3447, 2000.
- [3] Häring D.A., "Determinants of tannin concentrations in forage plants. Agronomic potential of tanniferous forage plants", dissertation ETH, Diss ETH No. 17237, 2007.
- [4] Mueller-Harvey I., "Analysis of hydrolysable tannins", Anim. Feed Sci. Technol., Vol 91, p. 3-20, 2001.
- [5] Frankel E. N. et al, "Inhibition of human LDL oxydation by resveratrol", The Lancet 341, 1993.
- [6] Grotewold E., "The Science of Flavonoids", Springer Science, Colombus, 2006.
- [7] Cusumano C., "Détermination des procyanidines dans diverses plantes alpines", travail de diplôme, Hes-so Sion, Sion, 2005.
- [8] Jaunin L., "Analyse des procyanidines dans un extrait de *Crataegus*", travail de semestre, Hes-so Sion, Sion, 2003.
- [9] Hagerman A.E., "Tannin Handbook", guide de laboratoire, Hagerman Laboratory, Miami, 2002.
- [10] Perret C., "Analyse des tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. ", thèse de doctorat, Université de Neuchâtel, Neuchâtel, 2001.
- [11] Thies S., "Bestimmungen von Procyanidinen in *Crataegus oxyacantha* e *monogyna fructus* deren wässrig-ethanolischen Extrakt sowie in Präparaten aus diesem", Endbericht, Hes-so, Sion, 2005.

- [12] Haslam E., "Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action", University Press, Cambridge, 1998.
- [13] Lacaille-Dubois M.-A. et al, Importance pharmacologique des dérivés phénoliques, *Acta Botanica Gallica* 143, Vol 6, P.555-562, 1996.
- [14] Escribano-Bailon T. et al, "Characterization of Procyanidins of *Vitis vinifera* Variety Tinta del Pais Grape Seeds", *J. Agric. Food Chem.*, Vol 40, p. 1794-1799, 1992.
- [15] Waterman P.G. et al, "Analysis of Phenolic Plant Metabolites", Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1994.
- [16] Santos-Buelga C. et al, "Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health", *J. Sci. Food Agric.*, Vol 80, p. 1094-1117, 2000.
- [17] Cusumano C., "Détermination des procyanidines totaux après hydrolyse acide", travail de semestre, Hes-so Sion, Sion, 2005.
- [18] Tomas-Lorente F. Et al, "Phenolic Compounds Analysis in the Determination of Fruit Jam Genuineness", *J. Agric. Food Chem.*, Vol 40, p. 1800-1804, 1992.
- [19] Schofield P. et al, "Analysis of condensed tannins: a review", *Anim. Feed Sci. Technol.*, Vol 91, p. 21-40, 2001.
- [20] Svedström U. Et al, "Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers", *Phytochemistry*, Vol 60, p. 821-825, 2002.
- [21] Yanagida A., "Characterization of polymerized polyphenols by size-exclusion HPLC", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, Vol 66, p. 1972-1975, 2002.
- [22] Jones G.A. et al, "Effects of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) Condensed Tannins on Growth and Proteolysis by Four Strains of Ruminal Bacteria", *App. Envir. Microbiol.*, Vol 60, p. 1374-1378, 1994.

- [23] Meager L.P. et al, "Characterization of condensed tannins from Lotus species by thiolytic degradation and electrospray mass spectrometry", *Anim. Feed Sci. Technol.*, Vol 117, p. 151-163, 2004.
- [24] Pasch H. et al, "MALDI-TOF mass spectrometry of polyflavonoid tannins", *Polymer*, Vol 42, p. 7531-7539, 2001.
- [25] Behrens A. et al, "MALDI-TOF mass spectrometry and PSD fragmentation as means for the analysis of condensed tannins in plant leaves and needles", *Phytochemistry*, Vol 62, p. 1159-1170, 2003.
- [26] Aeschimann D. et al, *Flore de la Suisse et des territoires limitrophes : le nouveau Binz*, 2e éd., Ed. du Griffon, 1994.
- [27] Booker F.L. et al, "Catechin, proanthocyanidin and lignin contents of loblolly pine (*Pinus taeda*) needles after chronic exposure to ozone", *New Phytol.*, Vol 132, p. 483-492, 1996.
- [28] Kodama S. et al, "Usefulness of catechins and caffeine profiles to determine growing areas of green tea leaves of a single variety, Yabukita, in Japan", *Journal of Health Science*, Vol 53, p. 491-495, 2007.
- [29] Kofink M. et al, "(-)-Catechin in Cocoa and Chocolate: occurrence and analysis of an atypical flavan-3-ol enantiomer", *Molecules*, Vol 12, p. 1274-1288, 2007.
- [30] Lazarus S.A. et al, "High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in food and beverages", *J. Agric. Food Chem.*, Vol 47, p. 3693-3701, 1999.
- [31] Porter L.J., "Polymeric proanthocyanidins, ¹³C NMR studies of procyanidins", *J.C.S. Perkin I*, p.1217-1221, 1982.

9. Remerciements

Je tiens à remercier les Dr. Umberto Piantini, Alain-François Grogg et Urban Frey pour leur aide et leurs conseils, l'équipe du labo phytoressources (Julien, Nadia et Christèle) pour leur aide, l'équipe du labo analytique (Pascal, Antoine, Stéphane M., Stéphane W. et Fabrice) et Thierry Udrisard au labo de génie chimique.

Un grand merci aussi à Denis, Julien, Rebecca et Daniela qui m'ont quand même bien fait rire...

10. Annexes

Annexe 1 : Matériel

Annexe 2 : Méthodes

Annexe 3 : Fiches de calcul

Annexe 4 : Chromatogrammes

Annexe 5 : RMN-C

Ces annexes ont été reliées et sont disponibles au laboratoire F202.

Samuel Pellaud